



**Vera Lúcia Martins Fevereiro Ruivo de Sousa**

Licenciada em Análises Clínicas e Saúde Pública

**Pesquisa de carbapanemases na secção de  
Urgência da Patologia Clínica do  
Hospital de São José**

Relatório de atividade profissional para obtenção do Grau de Mestre em Genética Molecular e  
Biomedicina

Orientador - Margarida Castro Caldas Braga,  
Professora Auxiliar, Departamento de Ciências da Vida, FCT-UNL

Júri

Presidente: Doutor José Paulo Nunes de Sousa Sampaio

Arguente: Doutora Rita Gonçalves Sobral de Almeida

Vogal: Doutora Margarida Casal Ribeiro Castro Caldas Braga



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Novembro de 2020**

**Pesquisa de carbapanemases na secção de Urgência do serviço de Patologia Clínica do Hospital de São José- CHULC**

“Copyright” Vera Lúcia Martins Fevereiro Ruivo de Sousa, FCT/UN e UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## **Agradecimentos**

Ao longo da realização deste relatório surgiram vários desafios, que foram superados com a ajuda de colegas de trabalho, família e amigos. Nesse sentido, venho por este meio agradecer a todos os que ajudaram na concretização deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora, Margarida Castro Caldas Braga, Professora Auxiliar na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, pela orientação e ajuda em algumas questões que surgiram e pelas sugestões feitas no sentido de melhorar o relatório.

Agradeço também à grande Instituição onde trabalhei, o Centro Hospitalar Universitário Lisboa Central-serviço de Patologia Clínica, aos colegas e amigos com que me cruzei e que me apoiaram ao longo deste projeto, disponibilizando o material necessário para a sua realização

Agradeço à minha família, pelo esforço que fizeram para eu ter o tempo e disponibilidade necessários, em especial ao meu marido David Sousa pelas palavras de encorajamento, amor e carinho.



## Resumo

Este Relatório de Atividade Profissional tem por objetivo a obtenção do Grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina, pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Aqui é descrito em pormenor a minha atividade curricular e profissional, enquanto Técnica de Análises Clínicas e de Saúde Pública, e o decorrer dos últimos anos da sua profissão inserida na urgência da área de Patologia Clínica do Hospital de São José (HSJ), Centro Hospitalar Universitário De Lisboa Central (CHULC).

A resistência aos antibióticos é considerada um problema de saúde pública e com o passar dos anos têm vindo a tornar-se cada vez mais sério. Os carbapenemos pertencem à classe de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e são considerados de último recurso no tratamento de infeções por Gram negativas. No entanto o uso destes conduziu ao surgimento de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenemos. O mecanismo mais frequente é o de produção de carbapanemases e o rastreio dos seus portadores é crucial.

O rastreio consiste na pesquisa de carbapanemases utilizando métodos sensíveis e específicos. Para tal foram desenvolvidos equipamentos de Biologia Molecular que permitem dar uma resposta rápida e segura. A junção destes equipamentos com métodos de microbiologia pode ser vantajosa, permitindo uma pesquisa mais abrangente.

O presente relatório visa descrever como é feita a pesquisa de carbapanemases na secção de Urgência do CHULC através de PCR em tempo real, contemplando as etapas de colheita, processamento e obtenção de resultados. Em paralelo, através deste documento pretende-se demonstrar qual a importância desta pesquisa e qual o impacto na saúde dos pacientes.

**PALAVRAS CHAVE:** Técnica de Análises Clínicas e de Saúde Pública, Biologia Molecular, Carbapanemases, PCR.



## **Abstract**

This Professional Activity Report aims to obtain the Master's Degree in Molecular Genetics and Biomedicine by the Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Here is described in detail my curricular and professional activity as a Clinical Analysis and Public Health Technician as also the integration of course of the last years of the profession into the urgency of the Clinical Pathology area of Hospital de São José (HSJ), Centro Hospitalar Universitário De Lisboa Central (CHULC).

Antibiotic resistance is considered a public health problem and over the years it has become increasingly serious. Carbapenems belong to the class of  $\beta$ -lactam antibiotics and are considered a last resort in the treatment of negative Gram infections. The use of carbapenems led to the emergence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. The most frequent mechanism is the production of carbapanemases and screening for their carriers is crucial.

Screening consists of searching for carbapanemases using sensitive and specific methods. For this purpose, equipment was developed for Molecular Biology, which allows a quick and safe response. The combination of this equipment with microbiology methods can be advantageous, allowing for more comprehensive research.

This report aims to describe how the search for carbapanemases is carried out in the CHULC emergency through real-time PCR, covering the stages of harvesting, processing and obtaining results. In parallel, this document aims to demonstrate the importance of this research and the impact on patients' health.

**Keywords:** Clinical Analysis and Public Health Technician, Molecular Biology, Carbapanemases, PCR.





## Índice Geral

Introdução.....	1
Capítulo I .....	2
Formação académica .....	3
Experiência profissional.....	3
Enquadramento profissional.....	4
Contextualização .....	5
Capítulo II .....	6
Objetivo do relatório de atividade profissional.....	7
Caracterização da secção de Urgência do HSJ.....	7
Capítulo III .....	9
As carbapanemases e o seu papel na resistência a antibióticos.....	10
Carbapanemases Classe A.....	11
Classe <i>Ambler</i> B.....	12
Classe <i>Ambler</i> C.....	12
Classe <i>Ambler</i> D.....	12
Métodos de deteção de carbapanemases .....	15
Sistema GeneXpert para deteção de carbapanemases .....	22
Automatização da PCR .....	22
PCR em tempo real .....	23
Multiplex PCR .....	24
Módulo GeneXpert.....	26
Cartuchos GeneXpert.....	26
Modulo I-CORE - <i>intelligent cooling/heating optical reaction</i> .....	27
Pesquisa de carbapanemases através do ensaio Xpert Carba-R .....	29
Controlo de qualidade.....	30
Primers e sondas TaqMan®.....	31
Limite de deteção .....	33
Amplificação e deteção do produto de PCR .....	35
Fases das PCR.....	35
Desnaturação .....	35
Hibridação.....	35
Extensão.....	36
Processamento da amostra no interior do cartucho.....	37
Deteção e visualização do produto de PCR.....	38
Sondas TaqMan®.....	38
Curva da reação de PCR em tempo real .....	41
Reflexão critica .....	44
Processamento da amostra e resultados .....	47
Amostras e Colheita .....	47

Processamento (Xpert Carba-R) .....	48
Resultados .....	50
Exemplos de resultados .....	51
Capítulo IV .....	60
Conclusões .....	61
Bibliografia .....	64
Anexos .....	67
Anexo I Curriculum Vital .....	68
Anexo II Certidão de Licenciatura .....	71



## Índice de Figuras

Figura III.1 - Componentes do <i>hardware</i> do GeneXpert GX-IV (Cepheid , 2016) .....	26
Figura III.2 - Componentes do cartucho GeneXpert (Cepheid , 2016) .....	27
Figura III.3 - Módulo I-CORE (Cepheid , 2016) .....	28
Figura III.4 - Esquema das etapas de cada ciclo de PCR – Desnaturação, hibridação e extensão (Adaptado de (Garibyan & Avashia, 2013)) .....	36
Figura III.5 - Representação geral das etapas de PCR realizada no sistema GeneXpert - Adaptado de (Cepheid , 2016) .....	37
Figura III.6 - Ilustração da estrutura de uma sonda TaqMan®, fluoróforo <i>reporter</i> na extremidade 5' e um <i>quencher</i> na 3' (Novais, Alves, & Silva, 2004) .....	38
Figura III.7- Ilustração do sistema TaqMan®, ligação ao alvo (1), progresso da enzima Taq polimerase (2), separação do fluoróforo do <i>quencher</i> (3) e emissão da fluorescência (4) (Novais, Alves, & Silva, 2004) .....	39
Figura III.8 -Espectro de emissão de corantes fluoróforos utilizados no sistema TaqMan (COELHO, 2013) .....	41
Figura III.9 - Exemplo de uma curva de PCR (Novais, Alves, & Silva, 2004) .....	42
Figura III.10 - Exemplo de curva de amplificação e limite de ciclo (Cepheid , 2016) .....	42
Figura III.11 - Exemplos do aspeto de zaragatoas aceitáveis para a pesquisa de carbapanemases (Cepheid, 2020) .....	47
Figura III.12 - Exemplos de zaragatoas não aceitáveis para a pesquisa de carbapanemases (Cepheid, 2020) .....	47
Figura III.13 - Exemplo de uma zaragatoa e respetivo meio de transporte - Adaptado (DELTALAB, 2020) .....	48
Figura III.14 - Representação do cartucho Xpert Carba-R e abertura para a introdução da amostra (Cepheid, 2020) .....	48
Figura III.15 - Ecrã inicial do <i>software</i> GeneXpert (Cepheid , 2016) .....	49
Figura III.16 - Esquema do processamento da amostra por parte do operador, inoculação de frasco de reagente (1), introdução da solução no cartucho (2) e colocação deste no módulo (3) (fonte Cepheid) .....	50
Figura III.17- Resultado negativo para os 5 genes e validação do ensaio (Cepheid, 2020) .....	52
Figura III.18 - Detecção do gene <i>bla<sub>IMP1</sub></i> e validação do ensaio (Cepheid, 2020) .....	52
Figura III.19 - Detecção do gene <i>bla<sub>VIM</sub></i> e validação do ensaio (Cepheid, 2020) .....	52
Figura III.20 - Detecção dos genes <i>bla<sub>VIM</sub></i> , <i>bla<sub>NDM</sub></i> e validação do ensaio (SPC) (Cepheid, 2020) .....	53
Figura III.21 - Detecção dos genes <i>bla<sub>NDM</sub></i> , <i>bla<sub>IMP-1</sub></i> e validação do ensaio (Cepheid, 2020) .....	53
Figura III.22 - Detecção dos genes <i>bla<sub>IMP1</sub></i> , <i>bla<sub>VIM</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-48</sub></i> e validação do ensaio (Cepheid, 2020) .....	54
Figura III.23 - Detecção dos genes <i>bla<sub>VIM</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-48</sub></i> , <i>bla<sub>NDM</sub></i> , <i>bla<sub>IMP-1</sub></i> e validação do ensaio (Cepheid, 2020) .....	54
Figura III.24 - Resultado positivo para os cinco genes e validação do (Cepheid, 2020). .....	55
Figura III.25 - Ensaio inválido (Cepheid, 2020) .....	55
Figura III.26 - Resultado do ensaio Xpert Carba-R onde é detetado o gene <i>bla<sub>OXA-48</sub></i> , gráfico e correspondente tabela (Sah, et al., 2019) .....	56
Figura III.27-Resultado positivo para a deteção dos genes <i>bla<sub>NDM</sub></i> , <i>bla<sub>KPC</sub></i> e <i>bla<sub>OXA-48</sub></i> em <i>E.coli</i> (Sah, et al., 2020) .....	58
Figura III.28 - Resultado positivo para a deteção dos genes <i>bla<sub>VIM</sub></i> , <i>bla<sub>NDM</sub></i> , <i>bla<sub>KPC</sub></i> e <i>bla<sub>OXA-48</sub></i> em <i>K. pneumoniae</i> (Sah, et al., 2020). .....	58
Figura III.29 - Detecção de genes <i>bla<sub>IMP1</sub></i> , <i>bla<sub>VIM</sub></i> , <i>bla<sub>NDM</sub></i> e <i>bla<sub>OXA-48</sub></i> em <i>E. coli</i> (Sah, et al., 2020). .....	59



## Índice de Tabelas

Tabela III.1 - Classe de carbapanemases e suas características Adaptado de (Queenan & Bush, 2007); (Viau, et al., 2015) .....	13
Tabela III.2 - Valores de <i>cutoff</i> para carbapenemos para <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter</i> sp, de acordo com o CLSI (Al-Zahrani, 2018).....	16
Tabela III.3 - Valores de <i>cutoff</i> para carbapenemos para <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>Acinetobacter</i> sp, de acordo com o EUCAST (Al-Zahrani, 2018) .....	16
Tabela III.4 - Comparação simplificada das características de alguns métodos não moleculares (Al-Zahrani, 2018) .....	20
Tabela III.5 - Comparação simplificada das características de alguns métodos moleculares (Al-Zahrani, 2018) .....	20
Tabela III.6 - <i>Primers</i> utilizados em vários estudos, sequência, onde tamanho do produto amplificado (Adaptado de (Queenan & Bush, 2007) (Monteiro, et al., 2012) (Mlynarcik, Roderova, & Kolar, 2016) .....	31
Tabela III.7- <i>Primers</i> utilizados no estudo (Gavronski, 2017) .....	33
Tabela III.8 - <i>Primers</i> e sondas correspondentes utilizadas na pesquisa de genes <i>bla<sub>KPC</sub></i> , <i>bla<sub>NDM</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-48</sub></i> e <i>bla<sub>VIM</sub></i> - Adaptado de (Weib, Engelmann, Braun, Monecke, & Ehricht, 2017).....	40
Tabela III.9 - Representação de três casos, indicando qual a amostra analisada, a bactéria e genes identificados e o tratamento aplicado (Sah, et al., 2020) .....	57





## Lista de Siglas e acrónimos

AmpC -  $\beta$ -lactamases da classe *Ambler C*

Carba NP - Carbapanemase Nordmann-Poirel

CHULC - Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Central

CMI - Concentração Mínima Inibitória

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

CPE - *Enterobacteriaceae* Produtoras de Carbapanemases

Ct - limite de ciclo ou Ciclo de *threshold*

DGS - Direção Geral de Saúde

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPI - equipamentos de proteção individual

ERC - *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenemos

ESBL -  $\beta$  lactamases de espetro alargado

FCT - Faculdade de Ciências e Tecnologias

EUCAST - European Committee on antimicrobial Susceptibility Testing

Hepes - tampão ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfónico

HSJ - Hospital de São José

IMI-1 - Carbapanemase Hidrolizante de Imipenem

IMP - Imipenemase

KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapanemase

LCR - Líquido cefalorraquidiano

LoD - Limite de deteção

MALDITOF MS - *matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry*

MBL - Metallo- $\beta$ -lactamase

MHT - teste de *Hodge* modificado

MIC - método de inativação de carbapenemo

NDM-1 - *New Delhi* metalo- $\beta$ -lactamase

NMC - Carbapanemase Não-Metal

OXA-48 - Oxacilinase do tipo 48

PCC - controlo de verificação da sonda

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

SME - Enzima de *Serratia marcescens*

SPC - *Sample Processing Control*

TSA - Teste de suscetibilidade a antibióticos,

TSDT - Técnico Superior de Diagnóstico e Terapêutica

UNL - Universidade Nova de Lisboa

VIM - *Verona integron-encoded metal-β-lactamase*



## Introdução

A Faculdade de Ciências e Tecnologia – FCT, da Universidade Nova de Lisboa – UNL disponibiliza um programa especial para a obtenção do Grau de Mestre para quem é detentor de uma licenciatura pré-Bolonha e tenha, pelo menos, 5 anos de experiência profissional. Assim, o presente Relatório de Atividade Profissional visa a obtenção do Grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina de acordo com o estabelecido para licenciados pré-Bolonha que disponham de escolaridade idêntica aos atuais mestres, carecendo apenas de satisfazer o estipulado na alínea b), do número 1, do artigo 20.º do Dec. Lei nº74/2006 de 24 de março.

Este trabalho divide-se em 4 capítulos, sendo que no primeiro é descrito a minha formação académica bem como a adquirida enquanto profissional, experiência profissional, enquadramento e contextualização.

No capítulo II é mencionado o objetivo deste trabalho bem como a descrição do serviço de Urgência do Hospital de São José (HSJ) e a sua ligação com a Biologia Molecular.

No capítulo III é feita uma breve introdução às carbapanemases, qual o seu papel na resistência a antibióticos, que tipos de métodos existem para realizar a sua pesquisa e no caso de serem detetadas o que acontece aos pacientes. É também abordado o equipamento GeneXpert, que utiliza em exclusivo a técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para a pesquisa de carbapanemases, na sua variante multiplex, através do ensaio Xpert Carba-R. Dentro do sistema é descrita a técnica base a PCR e posteriormente o ensaio Xpert Carba-R. É feita uma reflexão crítica acerca do ensaio, referindo alguns estudos de outros autores, permitindo fazer uma comparação com o sistema, visto que alguns dados de processamento não são fornecidos. São mostrados ainda alguns exemplos de resultados, retirados da bula do ensaio e de casos clínicos obtidos a partir de pesquisa bibliográfica.

No capítulo IV são apresentadas as conclusões do relatório assim com a reflexão sobre as mesmas.

## **Capítulo I**

## **Formação académica**

Ingressou no ano de 2001 na Escola Superior de Saúde Egas Moniz onde frequentou a licenciatura de Análises Clínicas e Saúde Pública em duas etapas compostas por o bacharelato no ano de 2004 com uma média de 16 valores e o grau de licenciatura foi adquirido no ano de 2005 com média de 15 valores.

Para além do currículo académico, frequentou um ano de estágio em três instituições: Hospital de São José, Hospital Fernando da Fonseca e Hospital das Descobertas. Este estágio foi estruturado nos seguintes módulos:

- Colheitas
- Hematologia
- Imunologia
- Bioquímica
- Microbiologia
- Imuno-hemoterapia

Após a conclusão da Licenciatura, e enquanto exercia a sua atividade profissional, continuou a frequentar cursos e formações com o objetivo de se manter atualizada em áreas que estão em contínua atualização.

## **Experiência profissional**

Durante a conclusão da Licenciatura, começou a exercer funções de Técnica Superior de Análises Clínicas no Hospital Egas Moniz onde recolhia amostras de sangue nos serviços de enfermaria.

De 2005 a 2020 exerceu a sua atividade profissional como Técnica de Análises Clínicas e de Saúde Pública no Centro Hospitalar Universitário Lisboa Central, composto por vários hospitais: Hospital de São José, Capuchos, Santa Marta, Dona Estefânia, Curry Cabral e Maternidade Alfredo da Costa. Ingressada na equipa de Urgência do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de São José.

Presentemente encontra-se a trabalhar no Centro Hospitalar Barreiro Montijo, onde se insere na equipa de Urgência do serviço de Patologia Clínica exercendo as funções de Técnica Superior de Análises Clínicas.

## **Enquadramento profissional**

A carreira de técnico de diagnóstico e terapêutica foi regulada pelo Decreto-Lei 384-B/85 de 30 de setembro e insere-se nos corpos especiais da saúde definida pelo Decreto-Lei nº 184/89 de 2 de junho.

Perante a “necessidade da criação de um novo estatuto de carreira para destes profissionais, articulando-o com a reformulação do ensino e a sua integração no sistema educativo nacional ao nível politécnico

O Decreto-Lei 564/99 de 21 de dezembro tem como objetivo “dotar a carreira de técnico de diagnóstico e terapêutica de um estatuto que melhor evidencie o papel dos profissionais no sistema de saúde, como agentes indispensáveis para a melhoria da qualidade e eficácia da prestação de cuidados de saúde”. No Artigo nº3 do Capítulo 1 é referido que a carreira “enquadra um conjunto de profissionais detentores de formação especializada de nível superior” e “no desenvolvimento das suas funções, os técnicos de diagnóstico e terapêutica atuam em conformidade com a indicação clínica, pré-diagnóstico, diagnóstico e processo de investigação ou identificação, cabendo-lhes conceber, planear, organizar, aplicar e avaliar o processo de trabalho no âmbito da respetiva profissão, com o objetivo da promoção da saúde, da prevenção, do diagnóstico, do tratamento, da reabilitação e da reinserção.”

No Capítulo 2, Artigo nº5, é mencionada a profissão de Técnico de análises clínicas e de saúde pública integrada na carreira de técnico de diagnóstico e terapêutica, responsável pelo “desenvolvimento de atividades ao nível da patologia clínica, imunologia, hematologia clínica, genética e saúde pública, através do estudo, aplicação e avaliação das técnicas e métodos analíticos próprios, com fins de diagnóstico e de rastreio”.

Anos mais tarde surge o Decreto-Lei n.º 110/2017 de 31 de Agosto que “estabelece o regime legal da carreira aplicável aos técnicos superiores das áreas de diagnóstico e terapêutica, doravante designada TSDT, em regime de contrato de trabalho nas entidades públicas empresariais e nas parcerias em saúde, em regime de gestão e financiamento privados, integradas no Serviço Nacional de Saúde (SNS) e os respetivos requisitos de habilitação profissional e percurso de progressão profissional e de diferenciação técnico -científica.”

No presente decreto-lei, o Governo “pretende garantir que os técnicos superiores das áreas de diagnóstico e terapêutica das instituições de saúde no âmbito do SNS possam dispor de um percurso comum de progressão profissional e de diferenciação técnico-científica, o que possibilita também a mobilidade interinstitucional, com harmonização de direitos e deveres, sem subverter a autonomia de gestão do sector empresarial do Estado.”

## **Contextualização**

O Centro Hospitalar de Lisboa Central, EPE foi criado em 28 de fevereiro de 2007 através do Decreto-lei n.º 50-A/ 2007 e juntou o Centro Hospitalar de Lisboa – Zona Central – Hospitais de S. José e Hospital de Santo António dos Capuchos – e os Hospitais de Santa Marta e de D. Estefânia.

O Decreto-Lei n.º 44/ 2012 de 23 de fevereiro de 2012 procede à extinção e integração por fusão no Centro Hospitalar de Lisboa Central, E. P. E., do Hospital de Curry Cabral, E. P. E., e da Maternidade Dr. Alfredo da Costa.

O Decreto-Lei n.º 61/ 2018, de 3 de agosto, reconhece oficialmente o Centro Hospitalar de Lisboa Central, EPE como centro universitário, passando a ser designado como Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Central, EPE (CHULC).



## **Capítulo II**

## **Objetivo do relatório de atividade profissional**

Neste relatório de atividade profissional, o objetivo principal é demonstrar como é feita a pesquisa de carbapanemases no CHULC, mais em concreto na secção de Urgência. Para tal será feita uma descrição da orgânica do fluxo de trabalho geral da secção, bem como a sua ligação com a Biologia Molecular.

Será feita uma análise crítica sobre o processo adotado no serviço de biologia molecular para a pesquisa de carbapanemases, enfatizando as vantagens e desvantagens do uso do sistema GeneXpert da *Cepheid*.

## **Caracterização da secção de Urgência do HSJ**

O CHULC é composto por 6 hospitais dotados de várias valências. No HSJ encontra-se o serviço de Urgência, à qual estão ligados vários serviços, incluindo o de Patologia Clínica. Dentro da Patologia Clínica encontram-se várias secções, nomeadamente triagem, hematologia e hemostase, bioquímica e virologia, imunologia, biologia molecular e urgência.

Na secção de urgência são realizados os pedidos urgentes de hematologia, hemostase, bioquímica, virologia, Biologia Molecular e Imunologia.

O horário de trabalho das equipas de Urgência é feito por turnos e durante os dias de semana das 8 as 20 horas a secção de Urgência conta com o apoio dos colegas da Rotina para o processamento de amostras não urgentes. Na Urgência são processadas amostras de sangue, urina, líquidos biológicos (Líquido Cefalorraquidiano (LCR), líquido peritoneal, ...), zaragatoas retais e nasofaríngeas.

Fazendo parte de um centro hospitalar, o HSJ é considerado um hospital central e de referência. O laboratório funciona 24 horas por dia todos os dias e assim sendo recebe amostras provenientes dos restantes hospitais pertencentes ao CHULC.

Ao falar de um laboratório é necessário referir que para um resultado com qualidade é preciso seguir uma organização que permita a rastreabilidade e controlo do processo:

- Fase pré analítica, engloba a prescrição feita pelo clínico, preparação e identificação do utente, colheita e transporte dos produtos biológicos para o laboratório.
- Fase analítica, consiste no processamento das amostras para se chegar ao resultado analítico. O controlo desta fase é feito através da realização de Controlo de Qualidade Interno e Externo.
- Fase pós analítica, engloba a revisão dos resultados obtidos, armazenamento e/ou eliminação das amostras. Nesta fase ocorre a validação e transmissão dos resultados ao clínico que os interpreta e avalia consoante a condição clínica do utente.

No serviço de Patologia Clínica, é da responsabilidade dos TSDT a receção, triagem e encaminhamento das amostras de sangue, urina, exsudados e outros líquidos biológicos.

A colheita de sangue é feita pelos TSDT nas enfermarias, pavilhão de consultas e posto de colheitas inserido no espaço físico da Urgência Geral. Os restantes produtos são colhidos pelos enfermeiros e/ou médicos.

Na secção de Urgência efetuam-se análises de várias áreas, nomeadamente, química, hematologia, coagulação, imunologia, virologia e algumas técnicas manuais.

A secção de Urgência tem um papel importante no meio hospitalar porque permite dar a resposta a problemas críticos, tais como, enfartes, distinguir a origem de infeções, hemorragias, avaliação geral do estado de saúde dos utentes que aí recorrem. No caso de infeções hospitalares é crucial uma resposta rápida e exata para serem aplicadas medidas de controlo e prevenção preconizadas pela Direção Geral de Saúde. Assim, a secção de Urgência dá continuidade ao trabalho da secção de Biologia Molecular fora do seu horário de trabalho, fazendo a pesquisa de carbapanemases a partir de zaragatoas rectais, que chegam diariamente ao serviço de Patologia Clínica, em grande quantidade e dos vários hospitais que compõem o CHULC. Esta pesquisa é feita em todos os pacientes que são internados em unidades de cuidados intensivos e é crucial para a deteção de portadores de bactérias resistentes a carbapenemos e, no caso de positivos, os profissionais procedem às medidas de controlo e prevenção de infeção.

O foco deste trabalho é a pesquisa de carbapanemases e por isso no capítulo III será descrito o equipamento e método utilizados no CHULC.

### **Capítulo III**

## As carbapanemases e o seu papel na resistência a antibióticos

O mecanismo de resistência a antibióticos mais frequente baseia-se na produção de  $\beta$ -lactamases de largo espectro por parte de bacilos Gram negativos (Nordmann, et al., 2012). Estes organismos são capazes de resistir contra vários fármacos  $\beta$ -lactâmicos, pertencendo maioritariamente às famílias de *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Dentro do grupo dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos encontram-se os carbapenemos (Imipenem, Meropenem e Ertapenem) que são capazes de atuar sobre as bactérias produtoras de enzimas  $\beta$  lactamases e são resistentes a estas. Os mecanismos de resistência variam entre as bactérias das famílias referidas acima. No caso das *Enterobacteriaceae*, a produção de carbapanemases é apontado como sendo o principal mecanismo (Al-Zahrani, 2018).

Os carbapenemos possuem um largo espectro de ação, são seguros e bastante úteis no tratamento de graves infeções provocadas por bacilos Gram negativos resistentes a outros fármacos (Bialvaei, Kafil, Asgharzadeh, Memar, & Yousefi, 2016). Esta característica torna-os fármacos de último recurso para tratar infeções provocadas por *Enterobacteriaceae* produtoras de  $\beta$ -lactamases de largo espectro (ESBL), no entanto o seu uso indiscriminado tornou as bactérias resistentes. A prevalência de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenemos (ERC) aumentou drasticamente, tornando-se num grave caso de saúde pública e têm sido reportados casos a nível mundial. A sua disseminação entre espécies bacterianas deve-se maioritariamente à sua capacidade de transmissão de genes codificantes, situados em elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos (Bialvaei, Kafil, Asgharzadeh, Memar, & Yousefi, 2016) (Cui, Zhang, & Du, 2019). A resistência aos carbapenemos também pode estar associada à elevada produção de ESBL ou de  $\beta$ -lactamases da classe *Ambler C* (AmpC), mediadas por plasmídeos ou cromossomas. A atividade destas enzimas pode coexistir com a impermeabilidade da membrana exterior devida à regulação de bombas de efluxo e/ou à perda ou mutação de porinas, impedindo a entrada do carbapenemo no seu interior (Sekyere, Govinden, & Essack, 2015)

As carbapanemases são enzimas que possuem a capacidade de hidrolisar os carbapenemos e os restantes  $\beta$ -lactâmicos (Bialvaei, Kafil, Asgharzadeh, Memar, & Yousefi, 2016). Para além desta característica, são também resistentes aos principais inibidores de  $\beta$ -lactamases comercializados. Apesar de se usar o termo específico de “carbapanemases” muitas destas enzimas atuam sobre vários antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Os investigadores preferem usar o termo “enzimas hidrolisantes de carbapenemos” em vez de “carbapanemases” sugerindo que são os únicos alvos da sua ação. No entanto o termo tem sido generalizado e usa-se com frequência (Queenan & Bush, 2007).

A classificação das  $\beta$ -lactamases, onde se inserem as carbapanemases, pode ser feita a nível molecular baseando-se na homologia de aminoácidos e denomina-se de *Ambler*. Assim dividem-se em

dois grupos, metal- $\beta$ -lactamases (MBL ou classe B), cujo centro ativo é composto por um ou dois iões de zinco, e as enzimas cujo centro é composto pelo aminoácido serina (classe A e D). A diferença no centro ativo das carbapanemases afeta a sua atividade hidrolítica, a resistência a outros  $\beta$ -lactâmicos e a resposta aos inibidores (Sekyere, Govinden, & Essack, 2015).

Existem vários tipos de carbapanemases já identificadas, classificadas em categorias e as mais prevalentes estão inseridas nos seguintes grupos (Al-Zahrani, 2018):

- Grupo A – *Klebsiella pneumoniae* carbapanemase (KPC),
- Grupo B metalo- $\beta$ -lactamase (MBL):
  - *Verona integron-encoded* metal- $\beta$ -lactamase (VIM)
  - Imipenemase (IMP)
  - New Delhi metalo- $\beta$ -lactamase (NDM)
- Grupo D
  - Oxacilinase do tipo 48 (OXA-48).

### Carbapanemases Classe A

Na classe A encontram-se as penicilinasas, sendo a KPC a enzima mais comum. Estas enzimas conferem resistência aos vários  $\beta$ -lactâmicos, incluído carbapenemos. A sua atividade é anulada pelos inibidores de  $\beta$ -lactamases, tal como o ácido clavulânico, ácido borónico e tazobactam (Nordmann, et al., 2012).

Dentro deste grupo encontramos carbapanemases codificadas por via de cromossomas, tais como a Carbapanemase Hidrolizante de Imipenem (IMI-1), a Carbapanemase Não-Metal (NMC), a Enzima de *Serratia marcescens* (SME) e de plasmídeos, a KPC e a IMI-2. Casos relacionados com a KPC foram registados pela primeira vez em 1996 nos EUA. As bactérias que produzem as KPC são sensíveis a poucos antibióticos, como por exemplo a colistina, e por isso as taxas de mortalidade são elevadas (Lee, et al., 2016).

Os genes codificantes para a KPC podem ser transmitidos entre várias estirpes de *Enterobacteriaceae* por isso não é exclusiva da *Klebsiella pneumoniae*, já foi detetada em várias estirpes de *Enterobacteriaceae*, nomeadamente *E. coli*, *Enterobacter* sp, *Citrobacter* sp, *Morganella* sp, *Serratia marcescens*, e *Salmonella*, e outras famílias, como *Aeromonas*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter baumannii* (Viau, et al., 2015). As bactérias que as exprimem são resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos, mas também a outros de outras famílias (Nordmann, et al., 2012).

### **Classe Ambler B**

No grupo B encontram-se as metal- $\beta$ -lactamases (MBL), onde se inserem a VIM, IMP e a NDM-1, as mais prevalentes. A NDM surge como a MBL com maior significado clínico devido à sua rápida expansão, sendo inicialmente detetada, na Suécia em 2007, num paciente proveniente da Índia, país endémico. Surgem em várias estirpes bacterianas, nomeadamente *Enterobacter cloacae*, *K. pneumoniae* e *E. coli* (Viau, et al., 2015)

As MBL hidrolisam todos os antibióticos, apresentando uma grande atividade enzimática sobre penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos, não atuando sobre o aztreonam (Nordmann, 2014). O mecanismo de hidrólise depende da ligação do antibiótico com o íão de zinco presente no seu sítio ativo, e por isso a sua ação é inibida pelo Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), um quelante de catiões, e ácido dipicolínico (Nordmann, et al., 2012).

### **Classe Ambler C**

Na classe C encontramos as cefalosporinases, produzidas por *Enterobacteriaceae* e a sua ocorrência é rara, apresentando uma fraca atividade perante os carbapenemos, no entanto o seu significado clínico é pouco conhecido (Viau, et al., 2015) (Nordmann, et al., 2012).

### **Classe Ambler D**

O terceiro grupo é composto por oxacilinases, OXA 48 e os seus derivados em *Enterobacteriaceae* e OXA-23, OXA-58 e OXA-143 em *Acinetobacter* sp. A OXA-48 foi detetada pela primeira vez em 2001 na Turquia e propagou-se para Europa continental, Médio Oriente e África do Norte. Posteriormente disseminou-se pelos EUA, Canadá e África do Sul. Foram reportados casos de OXA-48 em várias estirpes de *Enterobacteriaceae*, incluindo *Klebsiella* sp, *E. coli*, *Citrobacter* sp, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* sp, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* e *Salmonella* entérica (Viau, et al., 2015). Hidrolisam penicilinas, cefalosporinas de primeira geração e carbapenemos, mas a sua atividade é fraca sobre as cefalosporinas de segunda e terceira geração. A sua atividade não é inibida pelos inibidores de  $\beta$  lactamases referidos acima (Nordmann, et al., 2012).

Na Tabela III.1 pode-se ver as várias características de cada classe, dando exemplos, assim como as zonas endémicas, ou seja, onde são mais prevalentes e onde já ocorreram surtos. Nos parágrafos anteriores foram abordadas as classes individualmente.

Tabela III.1 - Classe de carbapanemases e suas características Adaptado de (Queenan & Bush, 2007); (Viau, et al., 2015)

<b>Classe</b>	<b>Centro ativo e localização</b>	<b>Atividade hidrolítica</b>	<b>Inibidores</b>	<b>Enzimas</b>	<b>Áreas endêmicas</b>
<b>A</b>	Aminoácido Serina, plasmídeo	Carbapenemos, cefalosporinas, penicilinas e aztreonam	Ácido clavulânico, ácido borónico e tazobactam	SME, NMC, IMI, KPC	América do Norte, Grécia, Itália, Polónia, Columbia, Argentina, Israel, China, Brasil
<b>B</b>	Ião zinco, plasmídeo e cromossoma	Carbapenemos, cefalosporinas e penicilinas	Quelantes de iões – EDTA e ácido dipicolínico	NDM, VIM, IMP	Índia Quênia, China, Grécia, Itália, França, Japão, Líbano, Brasil, Portugal, Irlanda, Reino Unido, Alemanha, Polónia
<b>C</b>	Serina, elementos moveis ou cromossoma	Cefalosporinas	Cloxacilina, ácido borónico	CMY-10	Mundial
<b>D</b>	Serina	Penicilinas (oxacilina e cloxacilina)	Não existem inibidores disponíveis	OXA-48	França, Bélgica, Canadá, África do Sul, Médio Oriente, Turquia, Norte de África, Suíça, Alemanha, Líbano, Israel, Marrocos

As bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* podem transportar vários genes de carbapanemases, mas a *Klebsiella pneumoniae* e a *Escherichia coli* são as estirpes onde se identificam mais genes de resistência, podendo apresentar diversos mecanismos. Na *Klebsiella pneumoniae* a forma mais comum é a produção da carbapanemase KPC codificada em plasmídeos. Outros genes incluem os relacionados com as metal- $\beta$ -lactamases, tais como VIM, NDM e IMP. Na classe D, encontram-se carbapanemases cujos genes lhes conferem uma baixa resistência a carbapenemos, OXA-48 e derivados. Os últimos são dificilmente identificados através de testes fenotípicos porque podem ser suscetíveis a cefalosporinas de largo espectro. As enzimas OXA-23 e OXA-58 podem ser encontradas em estirpes de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenemos (Traczewski, Carretto, Canton, & Moore, 2018).

Uma vez que os genes de carbapanemases são transmitidos via plasmídeos, as bactérias *Enterobacteriaceae* e não-*Enterobacteriaceae* podem atuar como reservatórios e vetores de transmissão. O trato intestinal constitui um reservatório para as *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapanemases (CPE), e por isso pode ocorrer a contaminação cruzada de pacientes. Assim, os programas de controlo de infeção assumem um papel crucial para impedir a propagação destes organismos patogénicos (Viau, et al., 2015).



A Direção Geral da Saúde (DGS) estabeleceu um plano de “Transmissão de *Enterobacteriaceae* Resistentes aos Carbapenemos em Hospitais de Cuidados Agudos” e após a sua análise retirei alguns pontos que considere mais importantes. Segundo este, a confirmação de colonização de um paciente com ERC implica que o mesmo seja isolado e que se adotem medidas de controlo, tais como, isolamento por contato em que é obrigatório, por parte dos profissionais de saúde, o uso de luvas, bata ou avental descartáveis, sempre que contatem com o mesmo. O paciente deve ser colocado, de preferência, num quarto isolado e todos os materiais necessários ao seu cuidado devem estar dentro do mesmo. O uso de máscara só é obrigatório no caso de tratamentos que originem aerossóis. No caso de pacientes autónomos devem ser sensibilizados para manterem a constante higienização das mãos, e não devem sair do seu quarto. Se o paciente for colocado num quarto com outros, devido à falta de quartos individuais, a sua cama deve ser sinalizada e os equipamentos de proteção individual (EPI) devem estar junto à mesma. No que diz respeito à descolonização, não existe uma recomendação para o mesmo visto que o reservatório natural é o intestino, sendo que o processo não é apropriado. Em alternativa, pode ser utilizado clorexidina a 2%, no banho a fim de reduzir a flora de ERC na pele. Esta prática pode ser realizada durante os primeiros 5 dias após a confirmação, tendo o cuidado de não prolongar por muito tempo visto que pode ocorrer resistência à clorexidina ou efeitos sobre a pele (Saúde, 2017).

Segundo o mesmo documento, os principais fatores que contribuem para a colonização ou infeção por ERC incluem (Saúde, 2017):

- Colonização ou infeção por ERC nos últimos 12 meses
- Administração de antibióticos, não apenas de carbapenemos, mas, também, de quinolonas e cefalosporinas de 3ª geração
- Historial de internamento, incluindo em cuidados intensivos
- Cirurgias ou tratamentos invasivos
- Apresentar pontos de infeção, tais como, escaras ou úlceras de pressão, estomas ou uso de algalias
- Diálise
- Dependência de terceiros devido a algum tipo de deficiência
- Imunodeprimidos ou transplantados
- Estadia em locais propensos a prevalência de ERC

Em relação ao rastreio, a DGS aconselha a ser feito através da colheita de uma zaragatoa retal, mas existem exceções, tais como, a colheita pode ser feita a partir de estomas, escaras ou feridas com conteúdo purulento. O processamento das amostras pode ser feito de duas formas, testes microbiológicos ou por técnicas de Biologia Molecular, nomeadamente, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Saúde, 2017).

Na próxima secção serão abordados alguns métodos de rastreio moleculares e não moleculares, mencionando no fim quais as suas vantagens e desvantagens.

## **Métodos de deteção de carbapanemases**

As bactérias Gram negativas, especialmente da família *Enterobacteriaceae*, são as grandes responsáveis por graves infeções adquiridas em comunidade ou em ambiente hospitalar, incluindo septicemia, endocardite, do trato urinário e pneumonia nosocomial. Estas infeções apresentam elevadas taxas de mortalidade, tratamentos inadequados e longos períodos de internamento. Os portadores, principalmente os assintomáticos, podem ser a principal fonte de disseminação em ambiente hospitalar e, devido a esse facto, o risco de contraírem infeções é elevado. O rápido diagnóstico e subsequente rastreio de pacientes internados, associados a medidas de prevenção, como o isolamento, são bastantes uteis para travar a propagação. A escolha de esquemas terapêuticos em unidades de cuidados intensivos, a implementação de medidas de controlo de infeção, a identificação rápida e precisa de pacientes colonizados recorrendo a testes laboratoriais são pontos de grande relevância (Bialvaei, Kafil, Asgharzadeh, Memar, & Yousefi, 2016).

Atualmente, os pacientes infetados ou colonizados por ERC são identificados com recurso a testes de suscetibilidade a colónias obtidas a partir de cultura de líquidos biológicos, tais como sangue, urina, fezes, entre outros. No entanto, este processo é moroso, visto que o intervalo de tempo que decorre desde a colheita da amostra e visualização de resultados pode ser de 2 a 5 dias. Poucos laboratórios fazem o rastreio de ERC e a distinção entre produtores e não produtores de carbapanemases. As instituições Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e o European Committee on antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) definiram valores de *cutoff* para os carbapenemos e atualizam-nos com regularidade (Banerjee & Humphries, 2017). Nas Tabelas seguintes III.2 e III.3 estão representados os pontos de *cutoff* determinados pelo CLSI e EUCAST no ano de 2018, para determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Inibição de carbapenemos (Al-Zahrani, 2018).

Tabela III.2 - Valores de *cutoff* para carbapenemos para *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* sp, de acordo com o CLSI (Al-Zahrani, 2018).

Bactéria	Carbapenem	CLSI 2018					
		S – Sensível, I – Intermédio, R – Resistente					
		CMI (mg/L)			Diâmetro do Halo de inibição (mm) para 10 µg		
		S	I	R	S	I	R
<i>Enterobacteriaceae</i>	Ertapenem	≤0.5	1	≥2	≥22	19-21	≥18
	Imipenem	≤1	2	≥4	≥23	20-22	≥19
	Meropenem	≤1	2	≥4	≥23	20-22	≥19
<i>P. aeruginosa</i>	Doripenem	≤2	4	≥8	≥19	16-18	≥15
	Imipenem	≤2	4	≥8	≥19	16-18	≥15
	Meropenem	≤2	4	≥8	≥19	16-18	≥15
<i>Acinetobacter</i> sp.	Doripenem	≤2	4	≥8	≥18	15-17	≥14
	Imipenem	≤2	4	≥8	≥22	19-21	≥18
	Meropenem	≤2	4	≥8	≥18	15-17	≥14

Tabela III.3 - Valores de *cutoff* para carbapenemos para *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* sp, de acordo com o EUCAST (Al-Zahrani, 2018)

Bactéria	Carbapenem	EUCAST 2018			
		S – Sensível, R – Resistente			
		CMI (mg/L)		Diâmetro do Halo de inibição (mm) para 10 µg	
		S	R	S	R
<i>Enterobacteriaceae</i>	Ertapenem	≤0.5	>1	≥25	≥22
	Imipenem	≤2	≥8	≥22	≥16
	Meropenem	≤2	≥8	≥22	≥16
<i>P. aeruginosa</i>	Doripenem	≤1	>2	≥25	≥22
	Imipenem	≤4	≥8	≥20	≥17
	Meropenem	≤2	≥8	≥24	≥18
<i>Acinetobacter</i> sp.	Doripenem	≤1	>2	≥24	≥21
	Imipenem	≤2	≥8	≥23	≥17
	Meropenem	≤2	≥8	≥21	≥15

O rastreio de bactérias produtoras de carbapanemases deve ser caracterizado por três aspetos, a rápida deteção, deteção de isolados com baixa resistência a carbapenemos e limites de deteção elevados permitindo o uso de amostras com número reduzido de organismos. Assim um bom teste de rastreio deve permitir obter resultados em pouco tempo, elevar a sensibilidade, boa especificidade, detetar vários tipos de carbapanemases e ser económico (Viau, et al., 2015).

Assim temos dois tipos de testes que podem ser utilizados no rastreio de carbapanemases, métodos baseados em meios de cultura e métodos baseados na amplificação de ácidos nucleicos (Viau, et al., 2015). O rastreio de carbapanemases pode ser feito a partir de diferentes matrizes, entre elas fezes, zaragatoas rectais ou colónias isoladas.

No caso de colónias isoladas, a primeira etapa consiste na deteção de suscetibilidade a carbapenemos, seguida pela execução de testes fenotípicos, que permitem identificar qual a bactéria em causa e o mecanismo. Como exemplo temos o teste de *Hodge* modificado (MHT), o teste Carbapanemase Nordmann-Poirel (Carba NP) e o método de inativação de carbapenemo (MIC). Outra alternativa para a deteção da atividade de carbapanemases é o uso de espetrometria de massa, *matrix-assited laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) (Lutgring & Limbago, 2016).

O MHT, Carba NP e MALDITOF MS não permitem identificar qual a carbapanemase em questão, mostrando apenas que existe atividade enzimática (Lutgring & Limbago, 2016):

- MHT, simples, de fácil execução e interpretação de resultados, económico e sensível à presença de carbapanemases KPC. Apresenta ainda sensibilidade para outras enzimas, como VIM, IMP e OXA-48. No caso da carbapanemase NDM, o desempenho da técnica é mais reduzido podendo transmitir falsos negativos, não sendo utilizado em países onde esta enzima é prevalente. Na presença de bactérias produtoras de enzimas *AmpC*, fenómeno associado a alterações de permeabilidade de membrana, podem-se verificar resultados falso positivos.
- CARBA NP, teste fenotípico que permite detetar carbapanemases a partir da hidrólise *in vitro* de imipenem. A hidrólise altera o pH levando à alteração de cor de um indicador de pH. Em termos de tempo é mais rápido que o MHT e sensível à maioria das carbapanemases, mas no caso da OXA-48, a sensibilidade é reduzida. A partir deste teste desenvolveram-se outros testes, nomeadamente, Blue-Carba e Rapidec CARBA NP, entre outros.
- MIC, trata-se de um teste muito sensível e consiste na incubação de uma suspensão da bactéria isolada com água contendo um disco impregnado com meropenem. Posteriormente, o disco é retirado e colocado num meio *Mueller-Hinton* inoculado com uma estirpe de *E. coli* sensível ao meropenem. A ausência de um halo de inibição confirma a hidrólise do meropenem e a presença de carbapanemases. Se na suspensão inicial não existirem carbapanemases, o meropenem não será hidrolisado e no meio observa-se uma zona um halo de inibição em redor do disco.

- MALDITOF-MS, permite uma identificação rápida de bactérias e tem sido utilizada para a pesquisa de carbapanemases, através da deteção dos produtos da degradação de carbapenemos. Tal com o MHT, não é sensível à OXA-48, mas foram sugeridas alterações ao método que permitam a sua deteção.

Existem ainda testes que permitem observar a atividade enzimática, com ou sem inibidores específicos. Temos o caso do ácido fenilborónico ou o EDTA que inibem as enzimas da classe A e B, respetivamente. Para além de permitir a deteção da produção de carbapanemases, também permite discriminar o tipo de enzima presente. Temos como exemplo, a adição de agentes quelantes (EDTA) a testes de suscetibilidade, como o E-teste um gradiente de concentração mínima inibitória, que permitem confirmar a presença de carbapanemases da classe B (MBL). Estes testes servem para comparar MIC de carbapenemos obtidos com ou sem o inibidor, que se liga ao zinco e inibe a atividade da MBL. O ácido fenilborónico é um inibidor das carbapanemases da classe A, nomeadamente KPC, sendo por isso incorporado em testes de suscetibilidade para a sua deteção (Lutgring & Limbago, 2016).

Os testes de difusão com vários discos vieram simplificar a diferenciação das enzimas, porque permitem o uso de vários inibidores específicos para cada tipo, incluindo o ácido fenilborónico (KPC e AmpC), EDTA e ácido dipicolínico (MBL), ácido clavulânico (ESBL), cloxacilina (AmpC) e temocilina (OXA-48). Estes testes apresentam taxas de sensibilidade elevadas, são económicos, de fácil execução, mas a interpretação pode ser complicada quando se verifica a presença de mais do que um mecanismo de resistência (Lutgring & Limbago, 2016).

Os testes referidos acima não são aconselhados para a análise direta de amostras fecais, sendo necessário fases de isolamento e de enriquecimento, mas sim como testes de confirmação após estas etapas (Viau, et al., 2015).

No caso de amostras de fezes e zaragatoas rectais, podem ser utilizados meios de cultura e testes de amplificação de ácidos nucleicos. Em matrizes fecais podem existir várias estirpes bacterianas, sem ser da família *Enterobacteriaceae*, que podem transferir genes e produzir carbapanemases, por isso será importante incluir nos protocolos de rastreios métodos que as detetem. Para além disso, a proporção de organismos produtores de carbapanemases no trato intestinal pode ser reduzida e assim a amostra colhida pode não ser representativa e estar abaixo do limite de deteção (LoD) (Viau, et al., 2015).

O uso de testes baseados em meios de cultura pode ser vantajoso porque são de fácil implementação, sendo que o conhecimento e material necessários já estão presentes na rotina diária dos laboratórios de microbiologia (Viau, et al., 2015). Existem meios sólidos cromogénicos que têm na sua composição substratos que libertam um pigmento quando hidrolisados pelas enzimas alterando a sua cor e a adição de antibióticos a estes meios permite torná-los seletivos para uma determinada estirpe resistente. Como exemplos destes meios temos CHROMagar KPC (CHROMagar, França), chromID Carba (bioMérieux, França), chromID ESBL (bioMérieux, França), chromID OXA-48 (bioMérieux, França), entre outros (Viau, et al., 2015), variando entre si em relação à sensibilidade e especificidade.

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos permitem detetar a presença de um ou mais genes específicos, limitando a sua pesquisa a sequências já conhecidas excluindo algumas variantes. Uma vez que existem vários genes que codificam diferentes carbapanemases e na impossibilidade de detetar todas as enzimas, o painel de pesquisa é abrangente às mais comuns. A extração de Ácido desoxirribonucleico (DNA) a partir de fezes, matriz ideal para a pesquisa de carbapanemases, é complicada porque podem ser extraídas substâncias inibidores de PCR e pode ocorrer um lise incompleta das células e cortes excessivos no DNA. A pesquisa de estirpes resistentes é mais fácil em matrizes onde é expectável apenas um organismo, urina ou sangue, em oposição das fezes, uma matriz mais complexa (Viau, et al., 2015).

Existem vários métodos baseados em amplificação de ácidos nucleicos que permitem a pesquisa de genes de carbapanemases, entre eles PCR e multiplex PCR convencionais, multiplex PCR em tempo real, *microarrays*, entre outros. A PCR convencional, é útil quando existe um gene alvo em grande quantidade, mas a especificidade só é avaliada se os dados positivos forem confirmados por sequenciação de DNA ou recorrendo à hibridação de sondas. Os *microarrays* são testes onde se usa uma superfície sólida onde estão ligados oligonucleótidos, onde hibridam os genes alvo com as sondas, a reação é medida através de um scanner. Este ensaio é complicado e não existem estudos sobre a sua aplicação em amostra de fezes. Podem ser utilizados no rastreio de  $\beta$  lactamases em colónias isoladas suspeitas. Apresentam elevada sensibilidade e especificidade e como exemplo temos o *Verigene BC-GN* que permite a deteção de seis genes (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>IMP-1</sub>*) (Viau, et al., 2015).

A PCR em tempo real, ou quantitativa, resulta da junção da técnica de PCR com a deteção do produto amplificado e tem sido utilizada como teste de rastreio de organismos produtores de carbapanemases em kits comerciais e laboratoriais. Este método permite obter resultados rápidos, elevada sensibilidade e especificidade (Viau, et al., 2015).

O estabelecimento de novos limites por parte do CLSI para a deteção de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenemos permite um rastreio mais eficiente dos portadores. Valores de CMI elevados em *Enterobacteriaceae* pode dever-se a dois mecanismos de resistência, produção excessiva de *AmpC* ou de ESBL associadas a alteração de porinas, e/ou produção de carbapanemases da classe A e/ou B. Assim sendo, os valores revistos e estabelecidos pelo CLSI podem constituir um rastreio vantajoso, mas não permite distinguir qual o mecanismo em causa. Os testes baseados em métodos moleculares surgem para colmatar esta lacuna, permitindo a identificação de genes (Monteiro, et al., 2012).

Na Tabela III.4 está representada uma comparação simplificada entre os métodos não moleculares e podemos constatar que a sensibilidade e especificidade para cada classe diferem entre si e em termos de resposta pode variar entre minutos até dias. Na Tabela III.5 estão representados alguns métodos moleculares, observando-se que são mais sensíveis, não existindo grandes variações entre as classes, no entanto, em termos de custo requerem mais investimento.

Tabela III.4 - Comparação simplificada das características de alguns métodos não moleculares (Al-Zahrani, 2018)

Métodos não moleculares	Técnica	Interpretação	Amostra	Tempo de resposta	Sensibilidade (%) para as classes de $\beta$ lactamases			Custo	Limitações
					A	B	D		
Teste de suscetibilidade a antibióticos (TSA)	Simples	Simples	Cultura pura	18-24 h	89.5% a 94.5%			Baixo a moderado	Baixa especificidade e sensibilidade para NDM, IMP e OXA-48
Teste de difusão	Simples	Simples	Cultura pura	18-24h	100	58-100	96.3	Baixo a moderado	Sensibilidade nula para enzimas do tipo OXA-48
Meios cromogénicos	Simples	Simples	Zaragatoas e fezes	18-24h	40-100	55-93	11.6-100	Moderado a alto	Não conhecidas
MHT	Simples	Simples	Cultura pura	18-24h	100	50-86	100	Baixo a moderado	Baixa sensibilidade para NDM, MBL e alguns OXA
CARBA NP	Simples	Simples	Cultura pura	5-120 min	100	100	72.5	Baixo a moderado	Baixa sensibilidade para enzimas com atividade reduzida, OXA-48
CIM	Simples	Simples	Cultura pura	18-24h	91	83-100	80-100	baixo	Dificuldade em detetar baixa atividade enzimática
MALDI-TOF	Simples	Médio	Cultura pura	75min-12h	78-100	100	76-100	Moderado a alto	Resultados falso-negativos e dificuldade em detetar especificamente (OXA-48)

Tabela III.5 - Comparação simplificada das características de alguns métodos moleculares (Al-Zahrani, 2018)

Métodos moleculares	Técnica	Interpretação	Amostra	Tempo de resposta	Sensibilidade (%) para as classes de $\beta$ lactamases			Custo	Limitações
					A	B	D		
PCR	Simples	Simples	Cultura pura	4-6h	92-100	98	98	Baixo a moderado	Não deteta novas carbapanemases ou novas variantes das já conhecidas
PCR em tempo real	Simples	Simples	Cultura pura ou amostras biológicas	60-120min	97-100	100	100	Moderado a alto	Não deteta novas carbapanemases
Microarrays	Médio	Médio	Cultura pura	2-8h	98	98	98	Moderado a alto	Não deteta novas carbapanemases

Resumindo, o teste ideal para a deteção de bactérias multirresistentes deve permitir obter um resultado em pouco tempo para garantir a rápida implementação de medidas de controlo, ajuste de tratamentos terapêuticos e permitir a deteção de enzimas carbapanemases (Bialvaei, Kafil, Asgharzadeh, Memar, & Yousefi, 2016). Antes de se recorrer a métodos mais dispendiosos, como os



moleculares, os não moleculares podem fornecer informação crucial. Para além disso, os métodos moleculares estão limitados na sua capacidade de identificarem novas carbapanemases ou novas variantes das já conhecidas (Bialvaei, Kafil, Asgharzadeh, Memar, & Yousefi, 2016).

Em termos económicos, os métodos não moleculares são mais baratos e podem ser aplicados em qualquer laboratório de microbiologia, mas podem apresentar algumas desvantagens, como no Carba NP a sua interpretação é difícil porque podem ocorrer resultados inválidos devido à presença de carbapanemases do tipo OXA-48. O MIC apresenta resultados ao fim de seis horas e não é adequado para espécies de *Acinetobacter*. Nos testes de difusão de disco necessitam de incubação para se lerem os resultados. Em conclusão, estes testes exigem tempo para ser interpretados o que se traduz na demora de apresentação de resultados, o que leva à demora na escolha e aplicação de tratamentos por parte dos clínicos (Traczewski, Carretto, Canton, & Moore, 2018).

O CLSI recomenda o uso do teste de *Hodge* modificado, enquanto que o EUCAST aconselha um método de combinação de discos impregnados com carbapenemos e inibidores de carbapanemases. Como primeiro passo para a deteção de carbapanemases, o teste de *Hodge* modificado pode ser útil, mas apresenta baixa sensibilidade e especificidade. O uso de inibidores enzimáticos permite determinar a qual classe pertence a enzima. Assim, para classe A é sugerida a aplicação de ácido borónico e para a classe B EDTA ou ácido dipicolínico. Para a classe D não existem inibidores disponíveis e por isso a presença de resistência elevada à temocilina é um indicador fenotípico da sua ação. Na deteção de cefalosporinas, pode ser adicionado ao teste a cloxacilina (Genc, Aksu, & Gulcan, 2016).

A pesquisa de pacientes cujo trato intestinal possa ser colonizado por organismos produtores de carbapanemases tornou-se numa prática comum a nível mundial, sendo recomendado para evitar a sua propagação, evitando a ocorrência de surtos. As metodologias utilizadas variam entre instituições e países, sendo que a mais recorrente é a cultura de zaragatoas rectais em meios cromogénicos. Os métodos moleculares são mais recentes e permitiram melhorar a sensibilidade e reduzir os tempos de resposta (Tato, et al., 2015).

O ideal seria rastrear todos os doentes admitidos ou que receberam alta, mas devido a questões económicas e físicas este rastreio é feito em unidades de maior risco, como cuidados intensivos, transplantes, oncologia e hemodiálise (Nordmann, et al., 2012)

A maioria das bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* encontra-se na nossa flora intestinal e por isso as fezes e zaragatoas rectais são as amostras mais apropriadas para a pesquisa de carbapanemases (Nordmann, et al., 2012).

A PCR apresenta grandes vantagens sobre os restantes testes, no entanto para alguns laboratórios os custos inerentes não são suportáveis e acabam por escolher outros testes adequados à sua situação financeira e população. No caso do CHULC, sempre foi importante a modernização dos equipamentos, assim como a melhoria nas condições de trabalho. O sistema GeneXpert veio simplificar o processo de pesquisa de carbapanemases, que era feita com recurso a meios cromogénicos. Com objetivo de agilizar os resultados e garantir a qualidade dos resultados adquiriu-se este sistema para



a secção de Biologia Molecular e, consequentemente, alargou-se o seu painel de testes para a hematologia e urgência. Em relação à Urgência, como foi referido, é feito um trabalho de continuidade com a secção de Biologia Molecular e como é um aparelho de fácil manuseamento os técnicos adaptaram-se, permitindo que o teste esteja disponível aos clínicos 24 horas por dia.

De seguida é descrito o sistema GeneXpert, incluindo os seus componentes, funcionamento, a metodologia PCR, e mais em pormenor, o ensaio Xpert Carba-R

### **Sistema GeneXpert para deteção de carbapanemases**

No CHULC optou-se por fazer apenas a pesquisa de carbapanemases, com o objetivo de fazer um rastreio de portadores de bactérias produtoras de carbapanemases. Para tal escolheram o sistema GeneXpert porque já tinham boa experiência com o equipamento noutras áreas e em termos de resposta é rápido. O sistema realiza o ensaio Xpert Carba-R utilizando como técnica a PCR, nomeadamente a sua variante Multiplex, permitindo a deteção de mais do que um gene em simultâneo.

A PCR é uma técnica com elevadas taxas de sensibilidade e especificidade, é de fácil execução, permite a análise de um variado número de amostras em simultâneo (Oliveira, et al., 2007) e o tempo de resposta é curto (Garibyan & Avashia, 2013). No entanto apresenta algumas limitações, tais como a amplificação de produtos inespecíficos resultantes de contaminação (Garibyan & Avashia, 2013), e o uso de *primers* implica o conhecimento prévio da sequência a amplificar. Por isso, a PCR só pode ser utilizada para detetar a presença ou ausência de um gene conhecido. Para além disto, os *primers* podem ligar-se de forma inespecífica a sequências similares. Ainda que raro, pode ocorrer uma incorporação incorreta de nucleótidos na nova cadeia pela ação da DNA polimerase (Garibyan & Avashia, 2013).

### **Automatização da PCR**

Um sistema automatizado deve apresentar taxas elevadas de sensibilidade e especificidade, permitir a análise a partir de vários tipos de amostras (ambientais, sangue total, zaragatoas), ser de fácil compreensão, necessitar de manutenção reduzida e conter os microrganismos patogénicos, reduzindo o risco de exposição (Ulrich, et al., 2006).

A PCR em tempo real em sistemas automatizados apresenta várias vantagens, tais como (Ulrich, et al., 2006):

- Tempo de preparação da amostra reduzido
- tempo de resposta mais curto
- diminuição de erros atribuídos ao operador, como erros de pipetagem e troca de amostra

Com o avançar da tecnologia, a PCR foi sofrendo adaptações e surgiram variantes, entre elas a PCR em tempo real, onde são usadas sondas fluorescentes para a deteção quantitativa (Schrader, Schielke, Ellerbroek, & John, 2012)

### **PCR em tempo real**

A PCR em tempo real define-se como sendo um método semi-quantitativo (qPCR), muito sensível e que permite obter resultados em curtos períodos. Na área médica é cada vez mais importante obter resultados rápidos e exatos, por isso a tecnologia de PCR em tempo real é utilizada mundialmente, sendo que existem vários protocolos e kits comerciais para identificar uma grande variedade de agentes patogénicos com relevância médica (HAAS & TORRES, 2016).

A técnica possibilita a deteção dos produtos da PCR durante a fase exponencial da reação, coincidindo a amplificação e deteção numa só etapa (HAAS & TORRES, 2016).

Para a realização da PCR em tempo real são necessários equipamentos compostos por um termociclador acoplado a um sistema ótico que permita a excitação e captação da fluorescência e um computador para a recolha e análise dos resultados da reação (HAAS & TORRES, 2016).

## **Multiplex PCR**

A técnica de “multiplex” foi desenvolvida com o objetivo de que com um único ensaio, altamente específico, se possa proceder à diferenciação entre várias espécies ou géneros em simultâneo permitindo a amplificação simultânea de mais do que uma sequência-alvo, através do uso de um conjunto de vários pares de *primers* (Oliveira, et al., 2007).

A técnica permite uma maior rapidez na obtenção dos resultados, assim como economizar os reagentes, quando comparada com a realização de uma PCR de modo individual para cada sequência alvo. Como são amplificados vários alvos simultaneamente na mesma reação, a quantidade de ácidos nucleicos pode ser menor podendo ser, por vezes, um fator limitante (HAAS & TORRES, 2016).

Para que a multiplex seja específica, as temperaturas de hibridação dos diferentes primers devem ser semelhantes e os fragmentos de DNA produzidos de tamanhos distintos (HAAS & TORRES, 2016). A sua eficácia depende de muitos fatores, nomeadamente da concentração de *primers*, de tampão, equilíbrio entre o cloreto de magnésio e a concentração de nucleótidos, das temperaturas aplicadas, da concentração de DNA molde e da enzima TaqDNA polimerase (Markoulatos, Siafakas, & Moncany, 2002).

O desenvolvimento do sistema GeneXpert veio permitir o uso de cartuchos que permitem conter no seu interior a amostra, eliminando processos manuais complexos, assim como a contaminação com material genético exógeno, agentes contaminantes ou inibidores de PCR. O processo de produção dos cartuchos inclui a incorporação no seu interior de reagentes de PCR liofilizados sob a forma de esferas e são de uso único. Para além disto, cada módulo é utilizado e controlado de forma independente permitindo o processamento de várias amostras em simultâneo com diferentes protocolos. O tempo necessário para a preparação da amostra, por parte do operador, é de cinco minutos e o restante decorre do processamento no interior do sistema (Ulrich, et al., 2006).

O processo de identificação de ácidos nucleicos de agentes infecciosos em vários tipos de amostras requer uma série de etapas, tais como preparação, amplificação e deteção. No sistema GeneXpert, estes passos estão combinados num cartucho, encurtando o tempo de resposta para 50 minutos (Ulrich, et al., 2006). Trata-se de um sistema fechado, composto por uma seringa e bombas que aspiram e movem a solução de amostra e reagentes através das várias câmaras, no seu interior.

Os inibidores de PCR podem ter origem na amostra, podem ser introduzidos durante o processamento da amostra ou quando ocorre a extração dos ácidos nucleicos. As grandes consequências que advêm da parcial ou total inibição da reação é a baixa sensibilidade ou falsos negativos (Schrader, Schielke, Ellerbroek, & John, 2012).

Os inibidores da PCR compõem um conjunto bastante vasto, podendo ser orgânicos ou inorgânicos. Por exemplo, os iões de cálcio podem atuar como inibidores inorgânicos, mas os mais comuns são orgânicos, tais como, sais biliares, ureia, etanol, polissacarídeos, melanina, várias proteínas como colagénio, mioglobina, hemoglobina, imunoglobulina G e proteinases. Podem ser

encontrados em várias fontes biológicas (órgãos, sangue, líquidos biológicos), amostras ambientais e comida. No caso de amostras de fezes, podem conter vários componentes inerentes da nutrição, flora intestinal e meio ambiente dos pacientes, tais como sais, lípidos e polissacarídeos (Schrader, Schielke, Ellerbroek, & Johne, 2012).

A extração de DNA do sistema GeneXpert é feita através do uso de uma membrana, localizada na base do cartucho, onde as células são separadas da mistura inicial, concentradas e lavadas para eliminar possíveis inibidores. O método de lise implementado no sistema foi o de sonicação por ultrassons, em que é aplicada energia na forma de ondas associada a esferas de vidro. (Ulrich, et al., 2006) (Vandeventer, et al., 2011). Estas esferas realizam a lise celular através de oscilação de alta frequência de um tubo contendo a suspensão. O diâmetro destas esferas é importante para a lise mecânica, sendo que as menores são mais eficientes (Vandeventer, et al., 2011). O uso da sonicação permite melhorar o limite de deteção (LoD), permite reduzir o tempo de deteção e melhorar a amplitude do sinal (Ulrich, et al., 2006). Posteriormente, os ácidos nucleicos são misturados com os reagentes de PCR e são encaminhados para a câmara de reação onde se dá o processo de termociclagem (Ulrich, et al., 2006) (Vandeventer, et al., 2011).

O método mecânico de lise é vantajoso porque alguns reagentes da lise química podem inibir a reação de PCR, sendo necessárias várias etapas e requer vários ciclos de lavagem (Ulrich, et al., 2006).

O uso de sistemas totalmente automatizados, que incorporem um método de lise mecânico de lise e transferência de líquidos automática para que ocorra a reação de PCR, permite obter resultados mais rápidos e evitar a interferência do operador (Ulrich, et al., 2006).

A contaminação cruzada de amostras negativas devida à formação de aerossóis ou por erro robótico são fatores de grande importância quando se desenvolvem aparelhos que incorporem a extração de ácidos nucleicos. Assim, no GeneXpert todo o circuito de fluidos, para a preparação da amostra e amplificação, ocorre dentro de um cartucho individual e descartável. Este circuito fechado contém qualquer agente patogénico presente, evitando a sua exposição ao operador, e como é de dimensões reduzidas pode ser adaptado a vários tipos de laboratórios (Ulrich, et al., 2006).

A deteção de vários sinais de fluorescência em simultâneo é outra das grandes vantagens do sistema, o sistema ótico foi desenhado de forma a conter vários detetores com diferentes filtros para captar o sinal emitido em bandas espectrais distintas (Ulrich, et al., 2006).

O sistema GeneXpert, segundo especificações do fabricante, é composto por um equipamento, um monitor, um computador de secretária e um leitor de códigos de barras. O equipamento pode variar no número de módulos (1, 2, 4 ou 16). A imagem do aparelho está na figura III.1.



Figura III.1 - Componentes do *hardware* do GeneXpert GX-IV (Cepheid , 2016)

O equipamento utilizado na secção de Biologia Molecular e Urgência é o ilustrado na Figura III.1, é composto por 4 módulos onde são inseridos os cartuchos com a amostra, proveniente de zaragatoas rectais, peri-rectais ou de colónias isoladas de bactérias não suscetíveis a carbapenemos. No CHULC as amostras utilizadas são zaragatoas rectais provenientes de pacientes internados em serviços de cuidados críticos.

### Módulo GeneXpert

Como foi referido acima e segundo o fabricante, o equipamento é composto por vários módulos e cada um contém, no seu interior, os seguintes componentes:

- Ativador da válvula – roda o corpo da válvula do cartucho para a aceder às diferentes câmaras.
- Haste do êmbolo – dispensa os líquidos para o interior das câmaras
- Emissor ultrassónico – realiza a lise dos microrganismos
- Módulo I-CORE – efetua a amplificação e deteção dos produtos da PCR

### Cartuchos GeneXpert

Segundo o fabricante, os cartuchos GeneXpert são de utilização única, descartáveis e guardam a amostra e os reagentes necessários à reação. .

Na Figura III.2 está representado um cartucho utilizado no sistema e cada um é composto pelos seguintes elementos (Cepheid , 2016):

- Câmaras de processamento onde se encontram as amostras, reagentes, amostras processadas e soluções residuais. Uma câmara designa-se como câmara de ar para equilibrar as pressões dentro do cartucho.

- Corpo da válvula, roda e permite que o líquido se mova para as diferentes câmaras e tubo de reação. Aqui a amostra é isolada, os inibidores da PCR são eliminados e é efetuada a lise das amostras, recorrendo a ultrassons. Uma vez processada, a amostra é misturada com os reagentes de PCR e transferida para o tubo de reação.
- Tubo de reação, permite que os ciclos ocorram assim como a excitação ótica e a deteção do seu conteúdo. O tubo de reação é inserido automaticamente no módulo I-CORE quando o cartucho é introduzido no módulo.

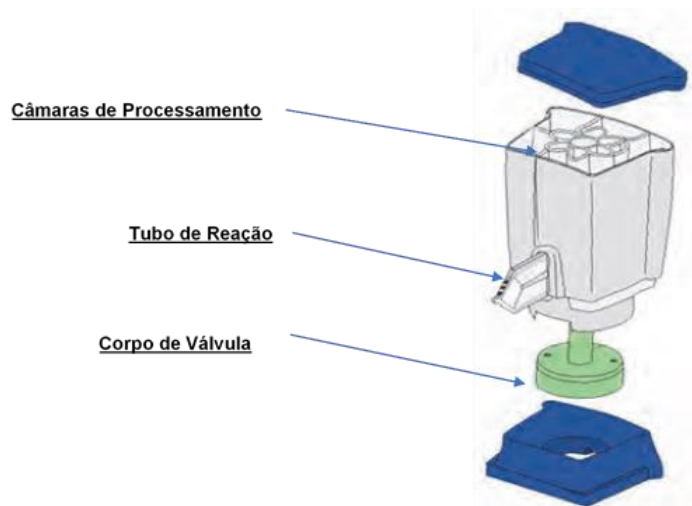


Figura III.2 - Componentes do cartucho GeneXpert (Cepheid , 2016)

### **Modulo I-CORE - *intelligent cooling/heating optical reaction***

O módulo I-CORE permite que ocorra uma oscilação da temperatura, através da ação de um aquecedor e de uma ventoinha, resultando numa reação ótica sensível ao arrefecimento e aquecimento. Este componente de hardware encontra-se em cada módulo onde é inserido o cartucho e efetua a deteção de amplificação através da fluorescência da PCR (Cepheid , 2016).

O processo inicia-se com a introdução do cartucho, momento em que o tubo de reação entra no módulo I-CORE e a mistura da amostra com o reagente é transferida para o seu interior. Durante a amplificação, o aquecedor I-CORE aquece e a ventoinha arrefece o conteúdo do tubo de reação. Nos blocos óticos ocorre a excitação das moléculas do corante e detetam a fluorescência emitida (Cepheid , 2016).

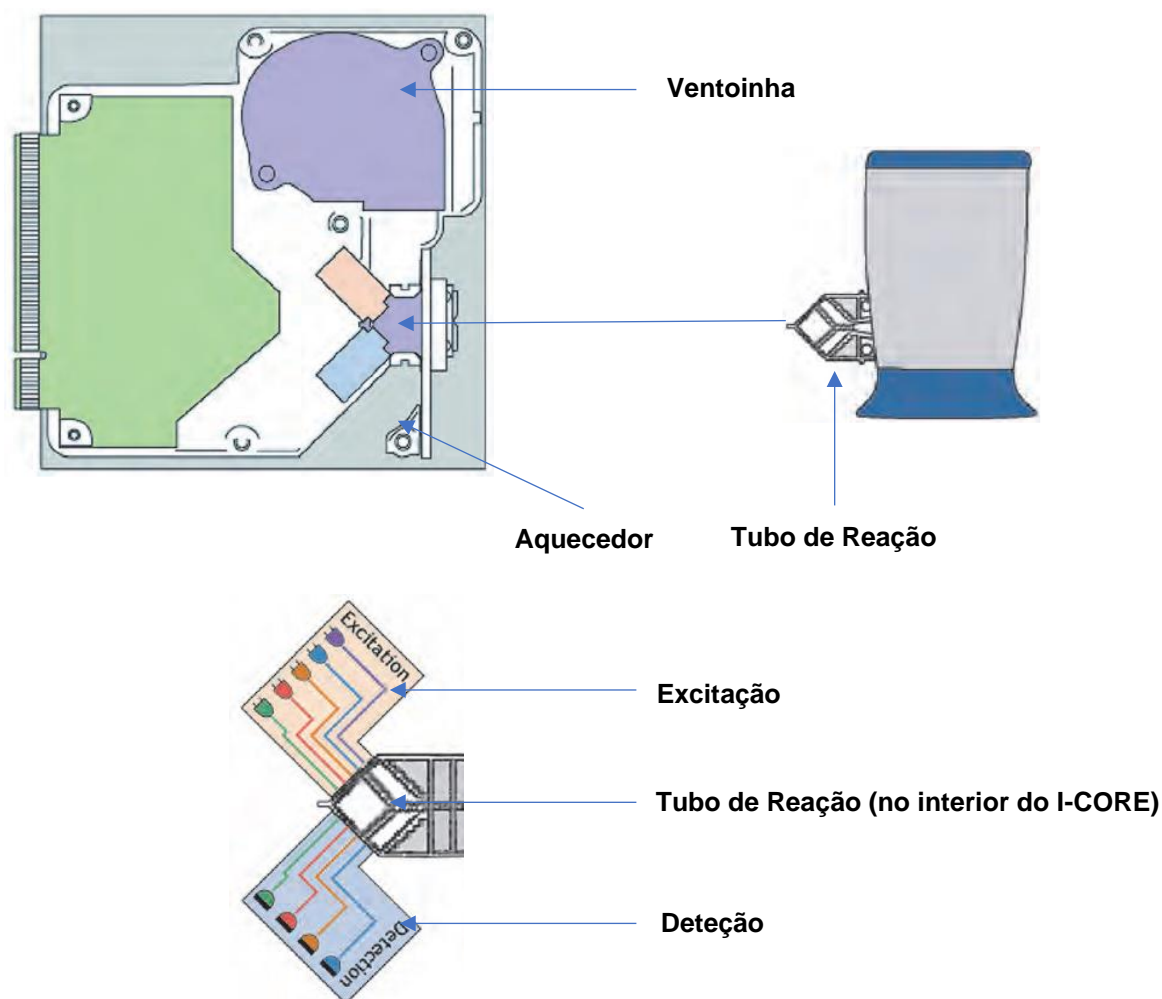


Figura III.3 - Módulo I-CORE (Cepheid , 2016)

O módulo I-CORE representado na Figura III.3 é composto pelos seguintes elementos (Cepheid , 2016):

- Aquecedor, constituído por duas placas cerâmicas com condutividade térmica alta e asseguram a uniformidade da temperatura e a rápida transferência de calor.
- Ventoinha de alta eficiência que arrefece o conteúdo do tubo de reação circulando o ar entre as placas do aquecedor
- Sistema ótico, onde ocorre a excitação e deteção da fluorescência

Neste processo a temperatura no interior do módulo é controlado pelo *firmware*, através de um ciclo de controlo garantindo o aquecimento rápido das placas e minimiza o aumento excessivo da temperatura (Cepheid , 2016).

O sistema ótico, observado também na Figura III.3, é composto por dois blocos (Cepheid , 2016):

- Bloco excitador de seis cores, composto por LED de alta intensidade que excitam as moléculas do corante “*reporter*” da sonda

- Módulo detetor de seis cores, onde se encontram fotodetores de silício e filtros que detetam as seis bandas espectrais

Os blocos estão posicionados no I-CORE de modo a que as suas aberturas se alinhem com as janelas óticas do tubo de reação, permitindo a excitação e deteção de emissão da fluorescência (Cepheid , 2016).

As sondas utilizadas denominam-se de TaqMan® e são marcadas com diferentes corantes fluorescentes, permitindo a deteção de até seis alvos em simultâneo num único tubo de reação (Cepheid , 2016).

### **Pesquisa de carbapanemases através do ensaio Xpert Carba-R**

A resistência a antibióticos relacionada a carbapanemases, por parte de estirpes de *Enterobacteriaceae*, é vista como um grave entrave no tratamento de infeções, nomeadamente nosocomiais. As carbapanemases mais prevalentes e com maior significado clínico estão incluídas em três classes, segundo a classificação de *Ambler*. Assim, na classe A temos a enzima KPC, na classe B a VIM, IMP e NDM, e na classe D a OXA-48. As AmpC, associadas à perda de porinas, podem apresentar atividade hidrolítica moderada sobre as carbapanemases e não estão incluídas nesta pesquisa (Genc, Aksu, & Gulcan, 2016).

Os métodos moleculares para a pesquisa direta de carbapanemases em amostras biológicas são recentes. O ensaio Xpert Carba-R é um teste de diagnóstico *in vitro* e tem como finalidade a deteção qualitativa dos genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>OXA-48</sub>*, associados à não suscetibilidade a carbapenemos em bactérias Gram negativas. O ensaio é realizado no sistema GeneXpert por reação de multiplex PCR, e como amostras podem ser utilizadas zaragatoas rectais ou isolados de culturas puras de bactérias não suscetíveis aos carbapenemos, tais como de estirpes pertencentes às famílias de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. O ensaio Xpert Carba-R tornou-se uma ferramenta essencial para a rápida deteção de pacientes colonizados a nível gastrointestinal por bactérias produtoras de carbapanemases (Moore, et al., 2017) (Traczewski, Carretto, Canton, & Moore, 2018).

Cada kit Xpert Carba-R contém o material necessário para processar 10 amostras, nomeadamente 10 cartuchos, 10 frascos com reagente de amostra e 10 pipetas de 1.7ml. O cartucho utilizado no ensaio inclui no seu interior os seguintes elementos, as concentrações de cada um não é especificada pelo fabricante (Cepheid , 2016):

- 3 Esferas por cartucho
  - ♦ Esfera 1, aplicada na preparação da amostra, processo de controlo e excipientes
  - ♦ Esfera 2 com reagente enzimático, TaqPolimerase, dNTP's, tampão ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il]-etanossulfónico (Hepes), sais (cloreto de magnésio) e excipientes



- ♦ Esfera 3, contém os *primers*, sondas TaqMan®, controlo interno SPC e PCC, tampão Hepes, sais e excipientes
- Reagente 1, - 3ml por cartucho
- Reagente 2, - cloreto de guanidina, 2.5ml por cartucho
- Reagente de amostra em frascos de 5ml

### Controlo de qualidade

Segundo o fabricante, no ensaio utiliza-se um controlo denominado “Sample Processing Control” (SPC) composto por esporos de *Bacillus globigii*, sob a forma de uma esfera congelada a seco, e verifica o processamento correto da amostra, a lise da bactéria caso esteja presente e deteta a inibição do ensaio associada à amostra, assegura que as condições de tempo e temperatura da PCR são as adequadas e que os reagentes estão operacionais. O SPC é processado juntamente com a amostra e sobre si também atua a sonicação para que ocorra a lise dos esporos. Os resultados para o SPC surgem representados em gráficos na forma de curvas positivas à medida que ocorre a reação. Quando a quantidade de DNA alvo for significativa ocorre uma competição pelos reagentes e a curva do SPC torna-se negativa. Este resultado ocorre devido ao desenvolvimento e otimização de um controlo específico que não compete pelos reagentes com o DNA alvo. O processo não é válido quando o SPC e a amostra dão negativos. No caso das amostras negativas, a curva do SPC é positiva indicando que o sistema executou a técnica adequadamente. Assim, o SPC deve ser positivo em amostras negativas e pode ser positivo ou negativo em amostras positivas, dependendo da quantidade de DNA alvo presente na solução (Cepheid, 2020) (Ulrich, et al., 2006).

O controlo de verificação da sonda (PCC) ocorre antes do início do ensaio, onde o sistema mede o sinal de fluorescência das sondas TaqMan®, monitorizando a reidratação da esfera onde se encontram, o enchimento do tubo de reação, a integridade das sondas e estabilidade dos corantes (Cepheid, 2020).

No ensaio realizado no CHULC o controlo de qualidade é feito somente com o controlo interno, incorporado no cartucho. No entanto, podem ser utilizados controlos externos que serão referidos nos parágrafos seguintes.

A pesquisa de carbapanemases no ensaio Xpert Carba-R pode decorrer em simultâneo com um controlo positivo, contendo os cinco genes detetáveis, e um negativo, sem os referidos genes (Altamimi, Alsalamah, Alkhulaifi, & Alajlan, 2016). Para além dos controlos internos, pode ser utilizado um painel externo, tais como os referidos no estudo de Tato et al (2016). Neste estudo os autores referem como controlo positivo *E. coli* inativada contendo um plasmídeo onde foram clonadas todas as sequências dos cinco genes, e como controlo negativo o mesmo isolado, mas sem as sequências. Os controlos foram produzidos por Maine Molecular Quality Control Inc., e o painel denomina-se M219 (Tato, et al., 2015).

Na avaliação feita por Traczewski et al (2018), além dos controlos internos e externos, recorreram a controlos individuais positivos para cada gene (Cepheid, 2020):

- *K. pneumoniae* produtora de KPC-2
- *K. pneumoniae* produtora de NDM-1
- *K. pneumoniae* produtora de VIM-1
- *K. pneumoniae* produtora de OXA-48
- *E. coli* produtora de IMP-1

### Primers e sondas TaqMan®

Os *primers* e sondas utilizados no ensaio Xpert Carba-R foram desenhados para detetar sequências específicas dos genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>OXA-48</sub>*, os mais frequentes relacionados com a não suscetibilidade a carbapenemos em bactérias Gram negativas. O desenho de *primers* inicia-se com a sequenciação de referência, o DNA de isolados de cultura foi purificado, quantificado e amplificado recorrendo a *primers* específicos para os cinco genes alvo. Estes *primers* foram desenhados para amplificar zonas maiores dos alvos (Cepheid, 2020). A confirmação do produto de tamanho adequado foi feita no sistema *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA).

O fabricante não fornece qualquer informação sobre a sequência dos *primers* e sondas utilizadas, mas na pesquisa bibliográfica foram encontrados alguns estudos onde foram descritas algumas sequências, pelo que serão referidas a título de exemplo.

Tabela III.6 - *Primers* utilizados em vários estudos, sequência, onde tamanho do produto amplificado (Adaptado de (Queenan & Bush, 2007) (Monteiro, et al., 2012) (Mlynarcik, Roderova, & Kolar, 2016)

Gene alvo	Primer	Sequência 5'-3'	Referência
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	Forward (F)	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	(Queenan & Bush, 2007)
	Reverse (R)	TTTTCAGAGCCTTACTGCCC	
	F	TCGTAAACTCGAACAGG	(Monteiro, et al., 2012)
	R	TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC	
	F	TGTTGCTGAAGGAGTTGGGC	(Mlynarcik, Roderova, & Kolar, 2016)
	R	ACGACGGCATAGTCATTTGC	
<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	F	TAAATACCTTGAGCGGGC	(Mlynarcik, Roderova, & Kolar, 2016)
	R	AAATGGAAACTGGCGACC	
	F	TTGGCCTTGCTGTCCTTG	(Monteiro, et al., 2012)
	R	ACACCAGTGACAATATCACCG	

<b>bla<sub>VIM</sub></b>	VIM-1 F	TTATGGAGCAGCAACCGATGT	(Queenan & Bush, 2007)
	R	CAAAAGTCCCGCTCCAACGA	
	F	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	(Monteiro, et al., 2012)
	R	AATGCGCAGCACCAGGATAG	
	VIM-2 F	AAAGTTATGCCGCACTCACC	(Queenan & Bush, 2007)
	R	TGCAACTTCATGTTATGCCG	
<b>bla<sub>IMP</sub></b>	F	CGCGGAGATTGARAAGCAAA	(Mlynarcik, Roderova, & Kolar, 2016)
	R	CGCAGCACCRGGATAGAARA	
	IMP-1 F	TGAGCAAGTTATCTGTATTC	(Queenan & Bush, 2007)
	R	TTAGTTGCTTGTTTTGATG	
	IMP-2 F	GGCAGTCGCCCTAAAACAAA	(Queenan & Bush, 2007)
	R	TAGTTACTTGGCTGTGATGG	
<b>bla<sub>OXA-48</sub></b>	variantes (exceto, IMP-3, IMP-16, IMP-27, IMP-31, IMP-34 e IMP-35) F	GAGTGGCTTAATTCTCRATC	(Monteiro, et al., 2012)
	R	CCAAACYACTASGTTATCT	
	F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	(Queenan & Bush, 2007)
	R	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	
	Inclui OXA199 e OXA-370 F	AACGGGCGAACCAAGCATTTT	(Mlynarcik, Roderova, & Kolar, 2016)
	R	TGAGCACTTCTTTTGTGATGGCT	
	F	TGTTTTTGGTGGCATCGAT	(Monteiro, et al., 2012)
	R	GTAAMRATGCTTGGTTCGC	

Nos estudos dados como referência na Tabela III.6 os *primers* foram desenhados a partir de genes sequenciados e descritos numa base de dados, o *GenBank*.

Mlynark et al (2016), desenvolveu dois protocolos de multiplex PCR para seis tipos de genes, cinco dos quais são os pesquisados no Xpert Carba-R. As sequências dos genes foram retiradas do *GenBank* e foram analisados no programa *Geneious Pro 4.8.5* (Biomatters Ltd, Newark, NJ, USA) com

o objetivo de identificar zonas adequadas para o desenho de *primers*. Os autores desenharam conjuntos de *primers* que foram testados contra estirpes de referência e clínicas, através de reações de PCR e de Multiplex PCR. No fim do estudo concluíram que os *primers* testados podem ser utilizados para o rastreio de carbapanemases produzidas por *Enterobacteriaceae* (Mlynarcik, Roderova, & Kolar, 2016).

Monteiro et al (2012) realizou o primeiro estudo onde desenvolveu um ensaio de Multiplex PCR para a deteção e identificação de seis genes *bla* de carbapanemases de classes diferentes. Os genes em questão são, *bla<sub>GES</sub>* e *bla<sub>KPC</sub>* (Classe A), *bla<sub>OXA-48</sub>* (Classe D) e *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>* e *bla<sub>VIM</sub>* (Classe B). Para conhecerem em detalhe os genes recorreram ao site: <http://www.lahey.org/studies> e de seguida as sequências foram retiradas da base de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Os *primers* foram desenhados de modo a amplificar todos os alelos dos genes de cada família de carbapanemases mencionadas. A confirmação da especificidade da reação foi feita através da avaliação dos *primers* em PCR convencional, verificando que cada um amplifica o seu respetivo alvo (Monteiro, et al., 2012).

Tabela III.7- *Primers* utilizados no estudo (Gavronski, 2017)

Gene	Sequência de primers (5' – 3')	Subtipos amplificados
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	F – GCC GGC TTG CTG GAC AC R – CGG ATG CGG TGG TTG C	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 24, 25, 26, 28
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	F-GCAGCATTTCTCTCATTTTC R – GTGATGCGTCTCCAACCTCA	1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 25, 26, 28, 30, 34, 38, 40, 42, 43, 51, 52, 55, 59, 60, 61, 63
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	F – GTT TGA TGG CGC AGT CTA CC R – CCG GGT AGT GTT GTT GAA TCC	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 49, 50, 51
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	F - GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC R - ATGCTGGCCTTGGGGAAC	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i> tipo	F - ACCAAGCATTTTTACCCGCA R – CCCAACCGACCCACCAG	54, 162, 163, 199, 204, 244, 245, 247, 252, 370, 405, 416, 438, 439, 505, 514, 515, 538

No estudo de Gavronski (2017), os *primers* utilizados foram os descritos na Tabela III.7 e os pares foram desenhados pela autora e avaliados no programa *PrimerSelect* (Lasergene®). A avaliação da especificidade foi feita com o recurso à aplicação *PrimerBlast* (NCBI). Como se pode constatar estes *primers* são abrangentes e podem detetar muitas variantes de cada gene de carbapanemase.

### Limite de deteção

O limite de deteção corresponde à concentração mais baixa de bactérias alvo presente em solução, sendo possível detetar o seu material genético. Na pesquisa bibliográfica foram encontrados vários estudos onde o ensaio Xpert Carba-R foi avaliado em vários aspetos, nomeadamente o limite de

deteção (LoD) através da análise de suspensões de isolados bacterianos conhecidos e que foram sujeitos a diluições seriadas, com o objetivo de determinar qual a diluição mais elevada em que o ensaio consegue detetar e amplificar o gene alvo.

Ko et al (2019), na sua avaliação do LoD do ensaio Xpert Carba-R realizaram diluições seriadas de suspensões com bactérias produtoras de cada gene em estudo e verificaram que os valores Ct mais elevados correspondiam às seguintes concentrações (Ko, et al., 2019):

- *bla<sub>KPC</sub>* – 36.5 para 225 UFC/zaragatoa
- *bla<sub>NDM</sub>* – 37.7 para 22.5 UFC/zaragatoa
- *bla<sub>VIM</sub>* – 32.2 para 2.250 UFC/zaragatoa
- *bla<sub>IMP-1</sub>* – 36.9 para 225 UFC/zaragatoa
- *bla<sub>OXA-48</sub>* – 37 para 225 UFC/zaragatoa

Através de análise estatística, concluíram que o ensaio Xpert Carba-R permite registar valores de Ct até 38, correspondendo a concentrações de organismos superiores a 46 UFC/zaragatoa (Ko, et al., 2019).

No estudo de Chung et al (2020), a avaliação do LoD do ensaio para a deteção dos genes *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>* permitiu concluir que o LoD do seu estudo é maior do que o estipulado pelo fabricante, e ainda sobre outros estudos. Os autores referem que o limite de deteção é influenciado pela concentração do gene em causa, visto que as colónias utilizadas são provenientes de amostras clínicas, é difícil de averiguar qual a pressão exercida pelo material genético bacteriano.

O fabricante refere que em estudos realizados com zaragatoas manipuladas verificaram que quando uma estirpe produtora de carbapanemases é inoculada em concentração similar ao LoD em conjunto com outra em concentração igual ou superior a  $5 \times 10^6$  UFC/zaragatoa, o gene alvo em menor quantidade não é detetado. Cury et al (2020), avaliaram o LoD do ensaio através da análise de zaragatoas imersas em diluições seriadas de suspensões contendo estirpes previamente caracterizadas como produtoras de carbapanemases, sendo que cada uma é portadora de um gene. As zaragatoas foram analisadas individualmente para cada gene e depois foi avaliada a combinação de genes, nomeadamente de *bla<sub>KPC</sub>* com os restantes. Os valores mais elevados de Ct, para cada gene, obtidos pelo ensaio foram os seguintes:

- *bla<sub>KPC</sub>* – 37.9 para  $10^1$  UFC/zaragatoa
- *bla<sub>NDM</sub>* – 37.6 para  $10^2$  UFC/zaragatoa
- *bla<sub>OXA-48</sub>* – 35.7 para  $10^3$  UFC/zaragatoa
- *bla<sub>IMP-1</sub>* – 37.5 para  $10^4$  UFC/zaragatoa
- *bla<sub>VIM</sub>* – 39 para  $10^3$  UFC/zaragatoa

Em paralelo, as zaragatoas com estirpes produtoras de KPC foram incubadas e inoculadas em meio seletivo contendo discos de carbapenemo, com o objetivo de avaliar o LoD da cultura de ERC. A

observação dos resultados do ensaio perante zaragatoas inoculadas com o gene *bla<sub>KPC</sub>* permitiu estabelecer o LoD como 10<sup>1</sup> UFC/zaragatoa, mas quando foram associadas às restantes com os outros genes os valores de LoD subiram para 10<sup>4</sup> UFC/zaragatoa. Portanto, nos casos de co-resistência o LoD pode aumentar, ocorrendo competição pelos reagentes.

Pode-se concluir que o LoD do ensaio é bastante reduzido, mas é influenciado pela concentração e tipo de bactérias presentes na amostra, e ainda pela coexistência de genes.

### **Amplificação e deteção do produto de PCR**

O processo de aquecimento e arrefecimento do módulo I-CORE permite, ao sistema GeneXpert DX, executar a PCR em tempo real, amplificando e detetando de forma exponencial a sequência alvo de DNA (Cepheid, 2016).

A PCR em tempo real utiliza a fluorescência para detetar as sequências alvo e inclui um mecanismo para determinar o ciclo no qual o DNA atinge uma quantidade significativa, denominado de limite de ciclo ou ciclo de *Threshold* (Ct). Esta técnica é composta por uma série de ciclos nos quais a mistura é aquecida e arrefecida a temperaturas específicas durante um determinado intervalo de tempo.

### **Fases das PCR**

#### **Desnaturação**

A temperatura atinge valores elevados (93° - 97°C), acima do ponto de fusão, para que a estrutura de dupla hélice do DNA seja dissociada (Yu, Cao, & Ji, 2017). A desnaturação permite que os *primers* se unam à região complementar à sua sequência na amostra de DNA. No primeiro ciclo pode ser realizada uma desnaturação mais longa, denominada de *hot START*, otimizando-a e eliminando a ocorrência de reações inespecíficas, nomeadamente a formação de dímeros de *primers* a temperaturas baixas, anterior ao começo da termociclagem (Markoulatos, Siafakas, & Moncany, 2002). Nos ciclos seguintes, o DNA permanece separado porque as cadeias complementares estão em concentrações muito baixas, o que impede a sua união. Os *primers*, por sua vez, estão em concentrações elevadas na mistura, o que ajuda no agrupamento das regiões complementares (Oliveira, et al., 2007).

#### **Hibridação**

Na etapa de hibridação, a temperatura desce (aproximadamente a 55°C), permitindo que os pares de *primers* específicos se liguem às sequências alvo do DNA molde na direção 3' – 5' (Yu, Cao, & Ji, 2017). No caso da variante multiplex PCR, para que os *primers* se liguem às suas zonas correspondentes, a temperatura aplicada é específica para cada par e depende do tamanho do *primer* e de sua sequência de nucleótidos (Oliveira, et al., 2007).

## Extensão

A temperatura volta a subir (aproximadamente a 76°C) e a TaqDNA polimerase sintetiza novas cadeias complementares do DNA molde ao adicionar os nucleótidos aos *primers*, na direção 5' – 3' (Yu, Cao, & Ji, 2017). A enzima Taq DNA polimerase posiciona-se junto aos *primers* que se ligaram na etapa anterior e, com a ajuda do magnésio, inicia a síntese de uma nova cadeia de DNA. Esta nova cadeia tem início a partir dos *primers* porque estes delimitam a região a amplificar (Oliveira, et al., 2007). A síntese ocorre através da adição na extremidade 3' do *primer*, do nucleótido complementar ao correspondente na cadeia molde. O fragmento amplificado por PCR encontra-se entre as duas extremidades 3' de um segmento duplex, complementares ao par de *primers* utilizados na reação (HAAS & TORRES, 2016). O resumo da reação de PCR está esquematizado na Figura III. 4.

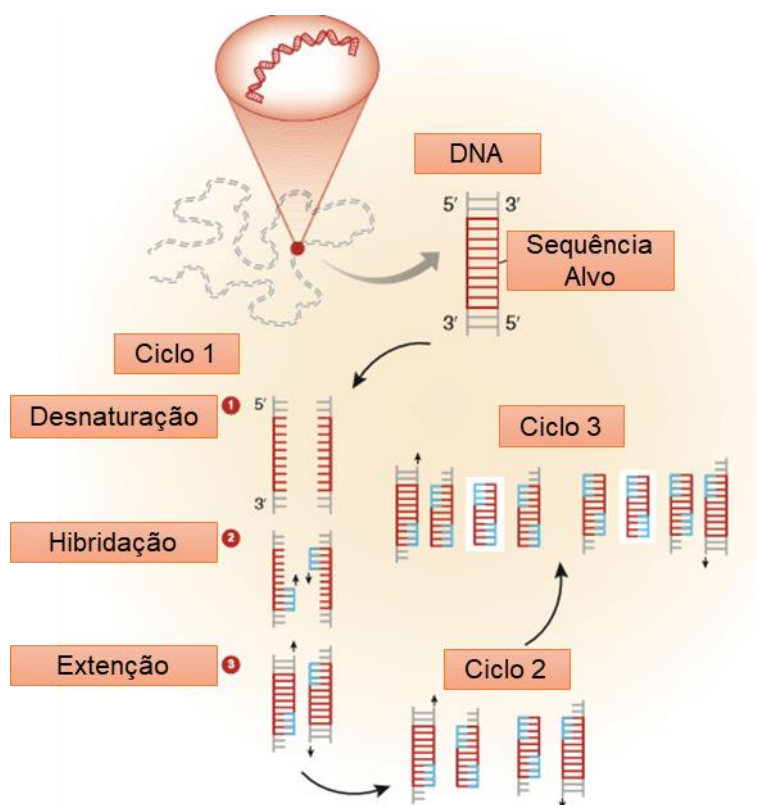


Figura III.4 - Esquema das etapas de cada ciclo de PCR – Desnaturação, hibridação e extensão  
(Adaptado de (Garibyan & Avashia, 2013))

Após cada ciclo, são sintetizadas novas cadeias, de forma exponencial, que servirão como modelo e segue-se o mesmo processo. Durante cada ciclo a concentração do produto amplificado aumenta exponencialmente. As etapas mencionadas acima são simples, mas o processo em si é complexo, a determinação da temperatura de hibridação, o comprimento da nova cadeia e o número de ciclos, são fatores que devem ser os apropriados a cada sistema de reação para evitar obter resultados falsos negativos ou positivos (Yu, Cao, & Ji, 2017).

No sistema GeneXpert, as condições de PCR são as seguintes (Cepheid , 2016):

- desnaturação inicial (*hot START*), onde ocorre a ativação da polimerase, ocorre durante 120 segundos e a seguir decorrem 40 ciclos, sendo que em cada ciclo decorrem as seguintes etapas:
  - Desnaturação, onde ocorre a separação das cadeias de DNA a uma temperatura de 95°C e dura 5 segundos
  - Hibridação, decorre a ligação do *primer* e das sondas TaqMan com a sequência alvo, caso esteja presente, a uma temperatura de 60°C e dura 30 segundos
  - Extensão, onde as cadeias de DNA são amplificadas e as sondas são clivadas a uma temperatura de 72°C e dura 10 segundos

Na Figura III.5 pode-se observar um esquema do protocolo de PCR efetuado no sistema GeneXpert, onde constam os intervalos de tempo e respetivas temperaturas de cada fase da reação de PCR.

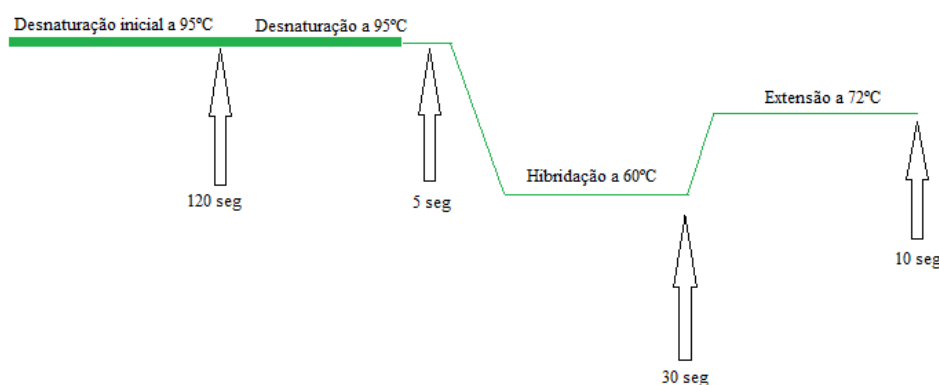


Figura III.5 - Representação geral das etapas de PCR realizada no sistema GeneXpert - Adaptado de (Cepheid, 2016)

### Processamento da amostra no interior do cartucho

Os cartuchos possuem no total 11 câmaras e no centro encontra-se uma válvula cilíndrica cujo movimento é rotativo e comandado por uma alavanca vertical ativada quando o cartucho é inserido no módulo. A ligação da alavanca com a válvula permite a transferência das soluções da amostra e dos reagentes armazenados no interior do cartucho, através das câmaras, por intermédio de pequenas aberturas na sua base. No cartucho está incorporado um filtro localizado na base do corpo da válvula, permitindo a retenção de bactérias, onde se liga um emissor ultrassónico e procede à lise celular. Os ácidos nucleicos libertados são conduzidos para outra câmara onde se encontram esferas congeladas a seco contendo os reagentes de PCR, que são reidratadas através do preenchimento da câmara. A solução é transferida para o tubo de reação, localizado na parte traseira do cartucho, encaixando na área composta por placas de aquecimento e por uma ventoinha (I-CORE), permitindo que ocorra a oscilação de temperatura necessário à PCR. Acoplado a esta área encontra-se um sistema ótico que permite a deteção da amplificação das sequências alvo, através da PCR em tempo real associada a



sondas fluorescentes, detetando a fluorescência emitida por estas após a sua excitação. A grande vantagem do sistema GeneXpert reside no facto de que como cada módulo é independente podem ser aplicados, em simultâneo, diferentes protocolos de PCR, ao contrário do que acontece em termocicladores tradicionais (Mitsakakis, D'Acremont, Hin, Stetten, & Zengerle, 2018)

### Deteção e visualização do produto de PCR

O sistema GeneXpert permite detetar a presença ou ausência do DNA alvo através do método de PCR em tempo real associada a oligonucleótidos marcados com corantes fluorescentes. Para tal recorre à tecnologia 5' nucleasse, onde se utilizam sondas marcadas com corantes fluorescentes numa extremidade e um agente de extinção na outra. Juntos formam um conjunto que reforçam a especificidade na deteção da sequência alvo. À medida que a nova cadeia é formada, a sonda é destruída e os agentes *reporter* e *quencher* são separados permanecendo livres na solução, sendo emitida fluorescência, que aumenta com a amplificação. O ciclo no qual é detetada esta fluorescência, após se atingir uma concentração significativa de cópias de DNA, denomina-se de limite de ciclo (Ct) (Cepheid, 2016).

A emissão de fluorescência deve-se ao uso de sistemas de sondas marcadas com fluoróforos, tal como no sistema TaqMan. Os fluoróforos são moléculas que absorvem e emitem luz em comprimentos de onda específicos. O seu uso permite acompanhar a reação de PCR à medida que esta decorre (Novais, Alves, & Silva, 2004). No ensaio Xpert Carba-R utilizam-se sondas TaqMan®, conferindo-lhe maior especificidade.

### Sondas TaqMan®

O sistema TaqMan® consiste no uso de pares de *primers* e sondas não extensíveis, sendo que a sonda corresponde a um oligonucleótido específico e pequeno que se liga à área delimitada pelos *primers* (Nagy, et al., 2017). As sondas, específicas para o gene de interesse, são duplamente marcadas com um fluoróforo *reporter* na extremidade 5' (F) e um fluoróforo *quencher* na extremidade 3' (Q), ilustrada na Figura III.6. Na sua forma original, a transferência da energia fluorescente dá-se pela emissão do *reporter* e absorvida pelo *quencher* (Oliveira, et al., 2007).



Figura III.6 - Ilustração da estrutura de uma sonda TaqMan®, fluoróforo *reporter* na extremidade 5' e um *quencher* na 3' (Novais, Alves, & Silva, 2004)

Este método baseia-se na atividade 5'-3' exonucleásica da Taq DNApolimerase (HAAS & TORRES, 2016). O processo está ilustrado na Figura III.7, à medida que se dá a amplificação, as sondas ligam-se à sequência alvo abaixo de um dos *primers*, formando um conjunto. Quando o *primer* começa a ser polimerizado, a Taq DNApolimerase aproxima-se da sonda e hidrolisa-a separando o *reporter* do *quencher*. Quando se dá a quebra da sonda o corante é libertado e excitado, emitindo fluorescência num determinado comprimento de onda, específico para cada sonda. O sinal de fluorescência emitido é proporcional à quantidade de produto de PCR formado (Nagy, et al., 2017).

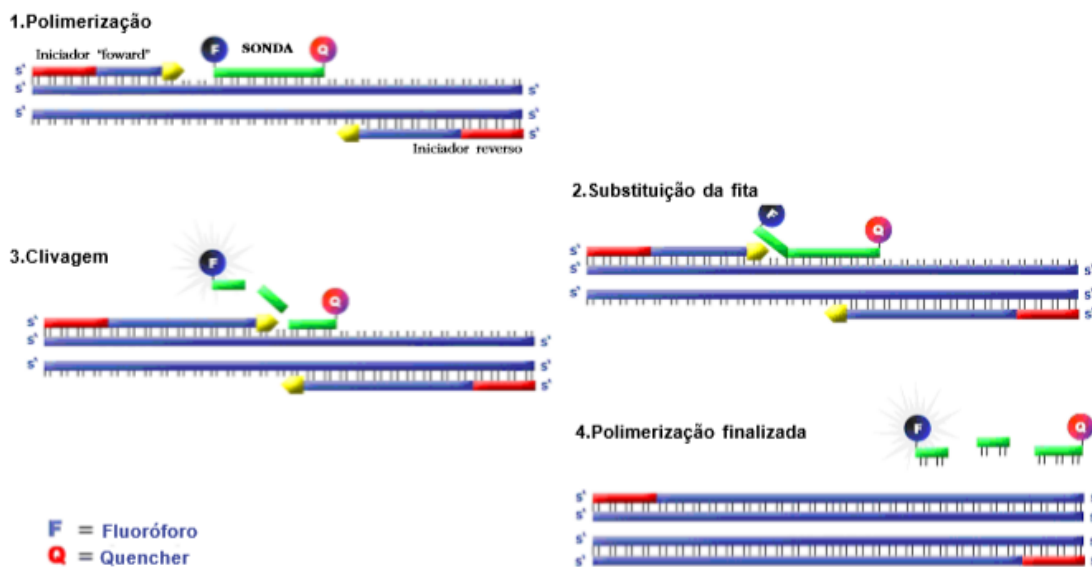


Figura III.7- lustração do sistema TaqMan®, ligação ao alvo (1), progresso da enzima Taq polimerase (2), separação do fluoróforo do *quencher* (3) e emissão da fluorescência (4) (Novais, Alves, & Silva, 2004)

O uso do sistema TaqMan® permite tornar a técnica muito específica, e a reação de PCR em tempo real associada a si é um método sensível ideal para determinar a presença ou ausência de sequências alvo específicas (Novais, Alves, & Silva, 2004).

As sondas marcadas permitem aumentar o nível de especificidade, mas também podem tornar a técnica mais suscetível às mutações que podem ocorrer no DNA molde. Se a região alvo sofrer alterações a ligação da sonda pode ser afetada parcialmente ou totalmente, levando a resultados falso negativos (Nagy, et al., 2017).

A especificidade do sistema TaqMan® é uma grande vantagem, mas a necessidade da síntese de diferentes sondas para sequências distintas e os custos que acarretam são grandes desvantagens (HAAS & TORRES, 2016).

Mais uma vez como o fabricante não especifica quais as sondas utilizadas no ensaio, na Tabela III.8 estão descritos conjuntos de *primers* e respetivas sondas aplicados num ensaio de multiplex PCR (Weib, Engelmann, Braun, Monecke, & Ehricht, 2017).

Tabela III.8 - *Primers* e sondas correspondentes utilizadas na pesquisa de genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>* e *bla<sub>VIM</sub>* - Adaptado de (Weib, Engelmann, Braun, Monecke, & Ehricht, 2017)

Nome	Sequência	GenBank
KPC F KPC R SONDA	CTGTATCGCCGTCTAGTTCTG AGTTTAGCGAATGGTTCCG 6FAM-TGTCTTGTCTCTCATGGCCGCTGG-BHQ1	EU447304
NDM F NDM R SONDA	GCATTAGCCGCTGCATT GATCGCCAAACCGTTGG ROX-ACGATTGGCCAGCAAATGGAACTGG-BHQ2	FN396876
OXA-48 F OXA-48 R SONDA	TTCCCAATAGCTTGATCGC CCATCCCACTTAAAGACTTGG HEX-TCGATTTGGGCGTGGTTAAGGATGAAC-BHQ1	AY236073
VIM F VIM R SONDA	TGGCAACGTACGCATCACC CGCAGCACCGGGATAGAA Cy5-TCTCTAGAAGGACTCTCATCGAGCGGG-BHQ3	YI8050.2

No estudo de Weib, Engelmann, Braun, Monecke, & Ehricht, 2017, os autores desenvolveram um protocolo para a pesquisa dos genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>* e *bla<sub>VIM</sub>*. Os *primers* e sondas TaqMan representados na Tabela III.8, foram desenhados no software *Alere*, de modo a garantir a ligação a regiões específicas dos genes alvo, permitindo a deteção dos vários alelos conhecidos até à data (agosto de 2016). As sondas foram desenhadas e na sua extremidade 5' encontram-se ligados os seguintes fluoróforos:

- 6FAM (verde)
- HEX (amarelo)
- ROX (laranja)
- Cy5 (vermelho)

Para além destes corantes existem outros que podem ser utilizados, tais como os representados na Figura III.8. No estudo dado como exemplo, não pesquisaram o gene *bla<sub>IMP-1</sub>* e na pesquisa bibliográfica não foi encontrado nenhum exemplo de sonda aplicada a este gene. Presume-se que qualquer um dos corantes referidos na Figura III.8 pode ser utilizado para tal fim.

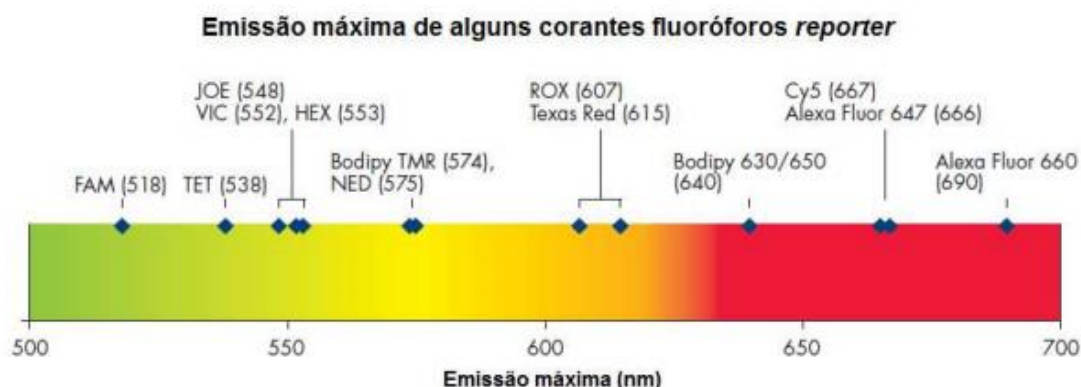


Figura III.8 -Espectro de emissão de corantes fluoróforos utilizados no sistema TaqMan (COELHO, 2013)

### Curva da reação de PCR em tempo real

O sinal de fluorescência é detetado a cada ciclo até atingir um limite, o *threshold*, onde todas as amostras podem ser comparadas. Este limite é definido na fase exponencial da reação de PCR e corresponde ao ponto em que a fluorescência emitida pela amplificação do ácido nucleico torna-se maior que a fluorescência de base. Na curva de PCR é determinado um ciclo limite denominado de Ciclo *Threshold* (Ct) que corresponde ao ponto em que a fluorescência emitida cruza o *threshold*. O valor de Ct varia consoante a quantidade de DNA molde presente na mistura, no sentido em que se a quantidade inicial for grande o Ct será mais baixo pois a quantidade de ciclos necessários para que se ultrapasse o *threshold* será menor (HAAS & TORRES, 2016).

Na PCR em tempo real, a amplificação pode ser apresentada como um processo com 4 fases, representada graficamente na Figura III.9 (HAAS & TORRES, 2016):

- Linha de base, em que a quantidade de produto amplificado encontra-se abaixo do nível de deteção do equipamento
- Exponencial, onde ocorre a taxa máxima de eficiência, o aumento da fluorescência é diretamente proporcional ao aumento da quantidade de produto amplificado durante os ciclos. Nesta fase dá-se o consumo da maior parte dos reagentes, podendo ocorrer competição no caso de vários genes alvo.
- Linear, dá-se um decréscimo da eficiência da amplificação devido ao consumo dos reagentes na fase anterior.
- *Plateau*, marca o fim da reação, quando se dão os últimos ciclos.

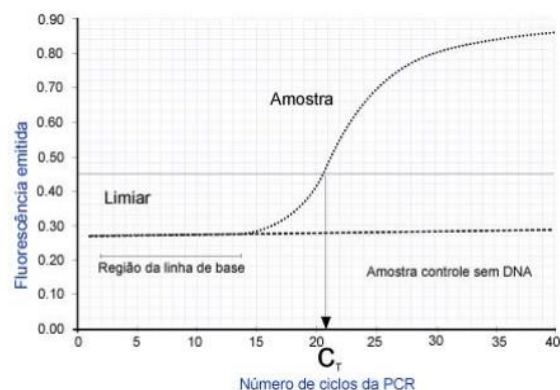


Figura III.9 - Exemplo de uma curva de PCR (Novais, Alves, & Silva, 2004)

Quando termina um ciclo, inicia-se outro, com as mesmas etapas de desnaturação, hibridação e extensão, e repetem-se, em média, até 40 vezes com o objetivo de se obter uma grande quantidade de DNA amplificado a partir do original. No fim de cada ciclo a quantidade de cópias de DNA alvo duplica e, com a evolução da reação, verifica-se um aumento exponencial (HAAS & TORRES, 2016).

No sistema GeneXpert, dá-se a mesma sequência de fases descritas, no fim de cada ciclo de PCR o sistema regista o sinal de fluorescência e no fim o software desenha uma curva de crescimento em que o eixo do x corresponde ao número de ciclos e o de y à fluorescência. Como se pode ver na Figura III.10, a fluorescência é proporcional à quantidade do DNA amplificado e à medida que a curva estabiliza, atinge-se um ponto em que a emissão de fluorescência cessa devido a outros fatores, tais como extinção dos reagentes. No caso de não ser detetado DNA a curva de crescimento surge como uma linha horizontal (Cepheid , 2016).

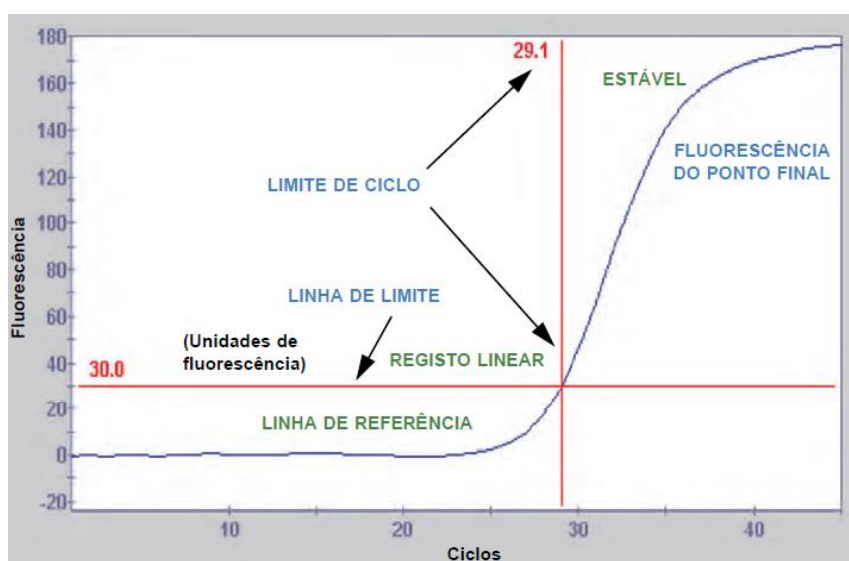


Figura III.10 - Exemplo de curva de amplificação e limite de ciclo (Cepheid , 2016)

A PCR em tempo real tornou-se um método bastante útil no diagnóstico clínico devido às adaptações que a PCR convencional sofreu para que seja utilizada em outros laboratórios, e não só em investigação e laboratórios de referência, apresentando as seguintes vantagens:

- O produto da PCR é monitorizado no interior do tubo de reação, não sendo necessária a deteção após a amplificação através de separação através de eletroforese
- O tempo de reação pode ser de aproximadamente uma hora
- A contaminação do produto final é menor, porque não é preciso ser manuseado
- O uso de vários corantes fluorescentes com comprimentos de ondas diferentes permite a deteção de mais do que uma sequência em simultâneo
- Existe a possibilidade de quantificar, uma vez que a fluorescência emitida é proporcional à quantidade de produto amplificado

As desvantagens incluem o elevado custo que acarreta a sua implementação em laboratórios menores e a otimização de protocolos, nomeadamente de multiplex PCR.

## Reflexão crítica

A multiplex PCR é uma técnica que permite a deteção de uma ou mais sequências em simultâneo, a partir de isolados de bactérias ou zangaratoas, tratando-se de um processo de fácil compreensão e adaptação.

Poirel et al (2010), fez um estudo mais abrangente sobre as carbapanemases, em que considerou e incluiu mais genes relevantes na sua pesquisa, no total onze. Para tal utilizou onze pares de *primers* que foram analisados individualmente e por multiplex PCR, avaliando a sua especificidade. Para facilitar a interpretação de resultados e tendo em conta o grau de relevância de cada gene, efetuou três ensaios de multiplex dividindo os genes alvo entre si. No fim concluiu que a análise em simultâneo de vários genes, face à PCR simples, apresenta bons resultados e elevada especificidade, confirmada pela visualização dos controlos positivos. Os resultados obtidos foram visualizados após a execução da eletroforese em agarose de cada ensaio. Trata-se de uma técnica rápida (4h) e eficaz que pode ser adaptada em laboratórios de zonas endémicas facilitando o rastreio destes genes, implementando uma PCR simples no caso de um único gene e se não for detetado partir para a multiplex PCR. No caso de áreas que haja suspeita de predominância de vários genes pode ser rapidamente aplicada, por exemplo, quando ocorrem surtos o ensaio multiplex é vantajoso e económico.

O estudo de Monteiro et al (2012) permitiu constatar que a técnica pode ser aplicada na deteção de seis genes em simultâneo, cinco dos quais são pesquisados no ensaio Xpert Carba-R, através da análise de vários isolados, em que alguns foram considerados resistentes a carbapenemos, registados por PCR e subsequente sequenciação para verificar a presença dos genes em estudo. Os restantes foram classificados como suscetíveis e considerados negativos para os genes. Segundo o autor, este foi o primeiro estudo em que a técnica foi utilizada num único ensaio para a pesquisa de carbapanemases de várias classes de maneira rápida (3 horas), sensível e específica.

No estudo de Weiß et al (2017) desenvolveram um ensaio de multiplex PCR associada à PCR em tempo real para a deteção de quatro genes de carbapanemases (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>* e *bla<sub>VIM</sub>*) em isolados bacterianos utilizando sondas TaqMan específicas para a deteção do produto amplificado. Os autores verificaram que a multiplex PCR em tempo real apresenta taxas de sensibilidade e especificidade elevadas e o tempo de execução encurtou para duas horas, para além disso, verificaram que a pesquisa pode ser feita diretamente sobre os isolados retirados de meios de cultura, permitindo a pesquisa de carbapanemases em colónias que apresentem baixa, ou até nula, suscetibilidade aos carbapenemos. Sugeriram ainda que a técnica apresentada pode ser utilizada em outras matrizes, permitindo o desenvolvimento de equipamentos, tais como o GeneXpert.

Os estudos referidos vêm validar o uso da técnica multiplex PCR, e a sua automatização, associando-a à PCR em tempo real, em sistemas como o GeneXpert, veio permitir a pesquisa de genes de carbapanemases de um modo rápido e eficaz. O sistema de sondas TaqMan tornou o ensaio altamente específico, visto que as sondas são desenhadas de modo a que sejam complementares com as sequências alvo e marcadas com diferentes corantes que emitem fluorescência quando ocorre a amplificação.



Os estudos de avaliação de desempenho permitem mostrar que o ensaio pode ser adaptado à medida que são descobertas variantes de carbapanemases. O facto de ocorrerem resultados negativos não quer dizer que não esteja presente nenhum gene que codifique uma carbapanemase, e através de sequenciação conseguem-se descrever novos genes, a partir dos quais se desenham *primers* que podem ser incluídos no ensaio.

Desde que o sistema GeneXpert foi desenvolvido, vários investigadores realizaram estudos de avaliação do seu desempenho na pesquisa de carbapanemases, concluindo que se trata de um equipamento confiável e seguro e sugeriram adaptações ao ensaio, nomeadamente a inclusão de novos *primers* para genes não detetados pelo ensaio.

Tato et al (2016), testaram uma nova versão do ensaio em que para além dos genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* e *bla<sub>VIM</sub>* foram incluídos os genes *bla<sub>OXA-48</sub>* e *bla<sub>IMP-1</sub>*, aumentando o seu perfil de deteção e permitindo a deteção em simultâneo destes genes mais prevalentes. Comprovaram ainda o uso de zaragatoas rectais para a pesquisa de carbapanemases através do seu processamento em paralelo com o ensaio, nomeadamente cultura em meio com um disco de meropenem seguida de sequenciação de DNA, tratando-se de um método igualmente sensível. O uso dos dois métodos permitiu concluir que existe concordância entre os resultados obtidos. No entanto registaram 6 casos que foram considerados negativos, mas através do método de referência foram detetados os genes, sendo a baixa concentração de bactérias na zaragatoa a provável razão apontada pelos autores. Verificaram ainda a capacidade do ensaio Xpert Carba-R em detetar múltiplos genes, comprovado pelos resultados obtidos após sequenciação. Observaram ainda um resultado positivo no ensaio, mas negativo na cultura, situação que pode ocorrer no caso de administração de antibióticos ao paciente ou se o organismo for portador de uma mutação do gene alvo, resultando em reduzida expressão ou até nula. Este estudo foi feito com o objetivo de se obter autorização para o ensaio ser distribuído pela Europa e os alvos (Tato, et al., 2015).

Moore et al (2017), realizaram um estudo onde avaliaram o desempenho do ensaio Xpert Carba-R na identificação dos cinco genes de carbapanemases. Para tal colheram zaragatoas a pacientes internados e prepararam outras zaragatoas com estirpes caracterizadas como resistentes e suscetíveis aos carbapenemos. Os testes de sensibilidade aos fármacos, culturas e sequenciação de DNA foram feitos à parte do ensaio Xpert Carba-R. Os investigadores determinaram que a deteção de apenas um gene representa um resultado positivo e a não deteção representa um resultado negativo. Verificaram que o ensaio é capaz de identificar mais do que um gene na mesma amostra e ocorreram alguns falsos negativos no ensaio Xpert Carba-R (*bla<sub>OXA-48</sub>* e *bla<sub>VIM</sub>*) em relação ao método de referência, talvez porque as bactérias portadoras destes genes estivessem em quantidade abaixo do LoD do ensaio. No geral verificou-se concordância entre os resultados do ensaio e método de referência validando-o e permitindo que seja aconselhado à deteção dos cinco genes. Os autores referem que num estudo anterior foi descrito um ensaio do mesmo fabricante em que eram identificados apenas três genes, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* e *bla<sub>VIM</sub>*, e que foram introduzidas modificações que permitiram detetar dois genes adicionais, *bla<sub>IMP1</sub>* e *bla<sub>OXA-48</sub>*. Mencionam ainda que após esta modificação, o ensaio não detetava as variantes relevantes da classe OXA-48, OXA-181 e OXA-232 que surgiram em países europeus, África



do Sul e Ásia. O fabricante voltou a modificar o ensaio adicionando *primers* e sondas específicas, incluindo estas variantes. No seu estudo, foram identificados genes de *bla<sub>OXA-181</sub>* e *bla<sub>OXA-232</sub>* em zaragatoas manipuladas, verificando a sua eficácia (Moore, et al., 2017).

Segundo Moore et al (2017), o ensaio Xpert Carba-R foi o primeiro teste a ser autorizado pela *Food and Drugs Administration* (FDA) para a deteção dos genes diretamente de zaragatoas rectais e análise de isolados bacterianos resistentes a carbapenemos, incluindo *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. Estas características vieram permitir a rápida identificação de pacientes colonizados a nível gastrointestinal, por estes organismos, ou a partir de uma amostra que revele não ser suscetível aos carbapenemos (Moore, et al., 2017).

Ko et al (2019), na sua avaliação de desempenho do ensaio Xpert Carba-R, utilizaram como amostras zaragatoas rectais de pacientes internados numa Unidade de Cuidados Intensivos e a sua análise foi feita com o ensaio referido. A sua eficácia foi determinada pelo processamento de novas zaragatoas, através de testes não moleculares, incluindo uma etapa de incubação e inoculação de um meio cromogénico seguido de testes de identificação e de sensibilidade aos carbapenemos. A deteção de ERC implicou a realização dos testes de *Hodge* modificado e de inativação de carbapanemases, tendo como referência os valores de *cutoff* recomendados pelo EUCAST e CLSI. Adicionalmente, efetuaram a PCR convencional para os cinco genes e novamente o ensaio Xpert Carba-R, com o objetivo de confirmar a presença de bactérias produtoras de carbapanemases. Os autores aconselham a combinação dos dois tipos de métodos porque a abordagem molecular deteta apenas os genes alvo e os não moleculares permitem identificar as bactérias resistentes. No entanto os últimos são menos sensíveis devido à presença em grande número de outras estirpes, nas amostras colhidas (Ko, et al., 2019).

Estes estudos permitem constatar que os resultados obtidos através da técnica de multiplex PCR são concordantes com os da PCR convencional e que a sua associação com a PCR em tempo real permitiu o desenvolvimento de equipamentos, como o GeneXpert, podendo ser analisadas vários tipos de matrizes. No entanto, o ensaio apresenta algumas limitações, tais como o facto de detetar genes específico, aconselhando-se a combinação com os métodos não moleculares. Para além disto, os estudos permitem constatar que o fabricante tem em conta o aparecimento de novos genes, desenvolvendo novas versões do ensaio.

Assim, o objetivo do ensaio Xpert Carba-R é detetar a presença de genes de carbapanemases, não tendo como finalidade a identificação de bactérias.

No que diz respeito à pesquisa de carbapanemases, no CHULC optou-se por realizar apenas o ensaio Xpert Carba-R para poderem ser identificados os seus portadores e proceder ao isolamento dos pacientes. No caso de infeção, em que é necessário identificar bactérias, serão feitos posteriormente outros testes na secção de Microbiologia, localizada no hospital Dona Estefânia.

## Processamento da amostra e resultados

### Amostras e Colheita

As zaragatoas rectais devem ser representativas da flora intestinal do paciente, por isso é crucial realizar a colheita seguindo as boas práticas e as normas do fabricante.

A colheita das zaragatoas é feita nos serviços pelos enfermeiros e/ou médicos e consiste na introdução da extremidade com algodão 1 cm para além do esfíncter anal e rodar (Cepheid, 2020). Ter em atenção que as zaragatoas não devem conter muita matéria fecal porque pode interferir com os resultados. Nas figuras III.11 e III.12 estão representadas quais as zaragotas aceitáveis ou não, consoante a quantidade de matéria fecal.



Figura III.11 - Exemplos do aspeto de zaragatoas aceitáveis para a pesquisa de carbapanemases (Cepheid, 2020)



Figura III.12 - Exemplos de zaragatoas não aceitáveis para a pesquisa de carbapanemases (Cepheid, 2020)

De salientar que, para o efeito de pesquisa de carbapanemases, as zaragatoas devem ter a haste de plástico e o meio de conservação é seco e esterilizado. O transporte e conservação é feito num contentor próprio, como o representado na Figura III.13 e mantido à temperatura ambiente.



Figura III.13 - Exemplo de uma zaragatoa e respetivo meio de transporte - Adaptado (DELTALAB, 2020)

Moore et al (2017) constataram que a deteção dos genes pode ser feita até cinco dias após a colheita, se as zaragatoas foram mantidas a uma temperatura entre 2 a 28°C dentro do meio de transporte adequado, como o ilustrado na Figura III.13.

### Processamento (Xpert Carba-R)

1. Adicionar a amostra da zaragatoa ao cartucho:

- Retirar da embalagem um cartucho, frasco com reagente de amostra e uma pipeta de 1.7ml
- Introduzir a zona de algodão da zaragatoa no frasco com o reagente de amostra e cortar a haste de modo a que seja possível fechar o frasco.
- Após fechar o frasco, agitar o mesmo no agitador de *vortex* durante 10 segundos, para que as bactérias presentes na zaragatoa sejam suspensas no líquido formando uma solução
- Abrir a tampa do cartucho, com a pipeta transferir 1.7ml da mistura de amostra com o reagente para a câmara de amostra (Figura III.14) e fechar a tampa
- A amostra restante no rasco de reagente pode ser conservada entre 2°C e 28°C até 4 dias a contar do dia em que foi feita a colheita, caso seja necessário repetir o ensaio.

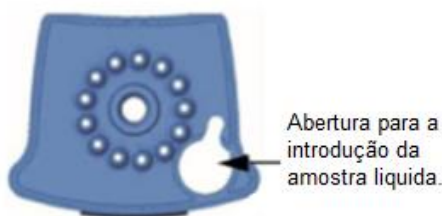


Figura III.14 - Representação do cartucho Xpert Carba-R e abertura para a introdução da amostra (Cepheid, 2020)

## 2. Programação do ensaio

- No *software* seleccionar “Criar teste”, no ecrã ilustrado na Figura III.15
- Ler duas vezes identificação do doente em código de barras
- Ler o código do cartucho Xpert Carba-R, o sistema preenche automaticamente os dados do ensaio e associa à amostra correspondente

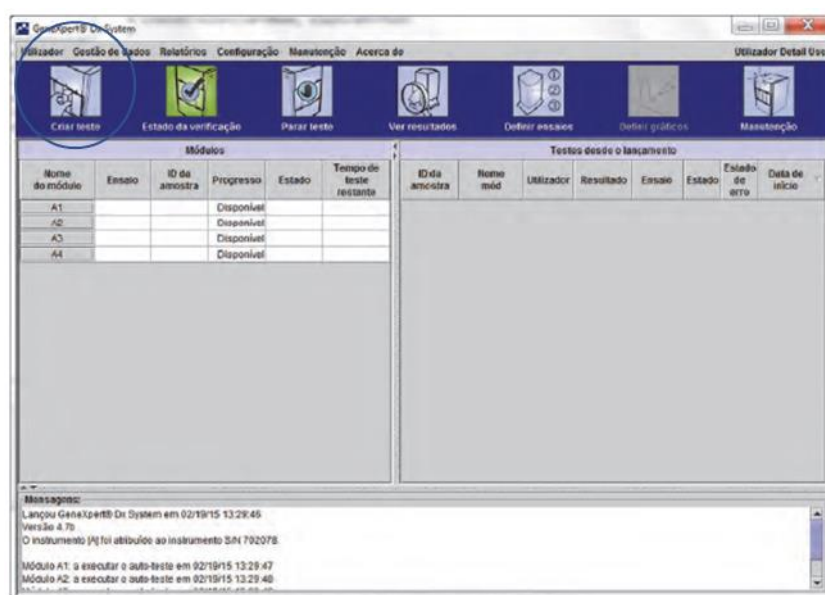


Figura III.15 - Ecrã inicial do *software* GeneXpert (Cepheid, 2016)

## 3. Introdução do cartucho

- Após a leitura da ID do cartucho, o sistema indica qual o módulo a utilizar
- Abrir a porta do módulo indicado e colocar o cartucho no seu interior
- Fechar a porta e clicar em “Iniciar teste”

## 4. No interior do módulo

- A amostra é transferida ao longo das várias câmaras por intermédio de válvulas e uma seringa, ocorre a extração de DNA, adição dos

reagentes 1 e 2, que contém as sondas TaqMan® e os *primers* e tudo o que será necessário para que a PCR ocorra.

- No fim ocorre a PCR para pesquisar se as sequências dos genes estão presentes
- A deteção é feita pelo sistema ótico e os resultados são representados em forma de gráficos

Nota: Importante Iniciar o teste dentro de 30 minutos após a adição da amostra ao cartucho.



Figura III.16 - Esquema do processamento da amostra por parte do operador, inoculação de frasco de reagente (1), introdução da solução no cartucho (2) e colocação deste no módulo (3) (fonte Cepheid)

Na Figura III.16 estão representadas as únicas etapas realizadas pelo operador, desde a inoculação do frasco de reagente com a zaragatoa, introdução da solução obtida após a agitação por *vortex* no interior do cartucho e posicionamento do cartucho no módulo onde será realizado o restante processamento da amostra.

## Resultados

A deteção de pelo menos um gene é considerado como resultado positivo e surge como “*Detected*”, no caso de um resultado negativo surge “*No detected*” (Moore, et al., 2017). Nos casos em que o resultado é indeterminado, pode surgir uma das seguintes respostas (Cepheid, 2020):

- “*Invalid*”, indica que o controlo SPC falhou. A amostra não foi processada de forma adequada, podendo estar presentes inibidores de PCR ou o volume da amostra adicionada foi o incorreto
- “*error*”, indica que o controlo de verificação da sonda falhou e em consequência o ensaio foi abortado, provavelmente devido ao preenchimento incorreto do tubo de reação, à

deteção de um problema de integridade da sonda ou a terem sido detetados problemas mecânicos ao nível de pressões e válvulas

- “No result”, indica que a reação não decorreu e por isso os sinais de fluorescência não foram emitidos, o sistema não recolheu os dados não sendo suficientes para desenhar o gráfico. Por exemplo, o operador parou o teste antes do tempo ou devido a falhas elétricas.

Nestes casos o ensaio será repetido com uma nova zaragatoa, frasco de reagente e cartucho. Sempre ter atenção que o ensaio deve ser realizado no prazo de 30 minutos após a inoculação do cartucho com a amostra.

Os resultados apresentados no final do ensaio Xpert Carba-R são automaticamente interpretados pelo sistema do equipamento GeneXpert, através da medição de sinais fluorescentes e algoritmos de cálculo integrados, e são de fácil interpretação. A PCR em tempo real veio simplificar a visualização e interpretação dos resultados, através da deteção de emissão de fluorescência, devido à quebra das sondas TaqMan®, ao fim de cada ciclo. Anteriormente, os resultados eram vistos após a realização de uma eletroforese em gel de agarose, que ainda é utilizada em laboratórios de investigação.

### **Exemplos de resultados**

Segundo o fabricante, o valor de Ct a partir do qual se considera um resultado positivo é de 38 (Ko, et al., 2019), no entanto este valor pode variar consoante a quantidade inicial de genes alvo presentes na amostra. Apesar de ser um teste qualitativo, o valor de Ct pode servir de indicativo sobre a quantidade inicial do alvo. Assim, se o gene em questão estiver em maior quantidade no início da reação o valor de Ct será mais baixo, porque não serão necessários muitos ciclos para atingir uma quantidade significativa de genes alvo para começar a visualizar o crescimento da curva, derivada da emissão de fluorescência pelas sondas TaqMan. No caso de o gene estar em menor quantidade o valor de Ct será maior porque serão necessários mais ciclos para que a amplificação ocorra para atingir um valor significativo. As seguintes imagens são representativas de possíveis resultados.

- Resultado negativo – a título de exemplo observa-se uma curva, na Figura III.17, correspondente ao controlo interno SPC, validando o ensaio e como não são registadas curvas associadas aos genes conclui-se que não foram detetados.

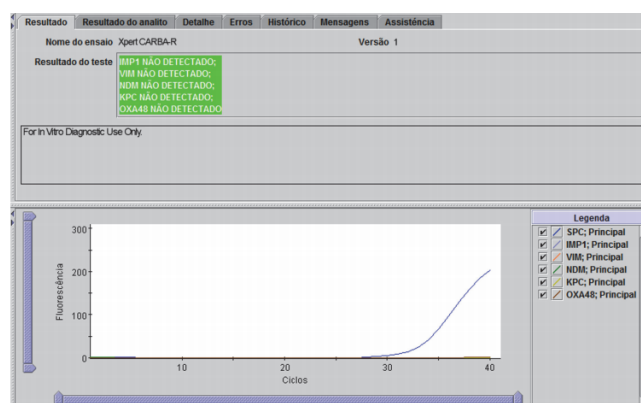


Figura III.17- Resultado negativo para os 5 genes e validação do ensaio (Cepheid, 2020)

- Resultado positivo para  $bla_{IMP1}$  – Na Figura III.18 observamos duas curvas, a curva do SPC, validando o ensaio, e outra que corresponde ao gene  $bla_{IMP1}$ , concluindo que foi detetado e amplificado o gene em questão.

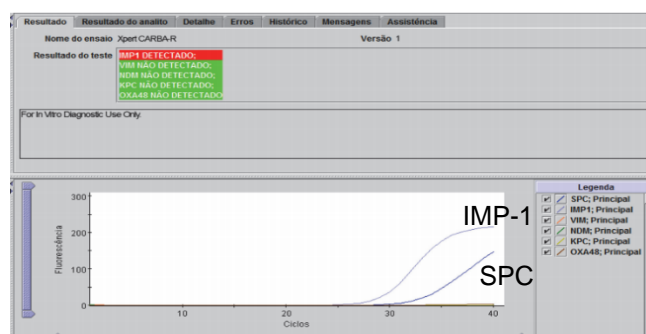


Figura III.18 - Detecção do gene  $bla_{IMP1}$  e validação do ensaio (Cepheid, 2020)

- Resultado positivo para o gene  $bla_{VIM}$  – na Figura III.19 observa-se que foi detetado o gene  $bla_{VIM}$  através da visualização de uma curva e em simultâneo surge a curva do controlo SPC, o que torna o ensaio válido

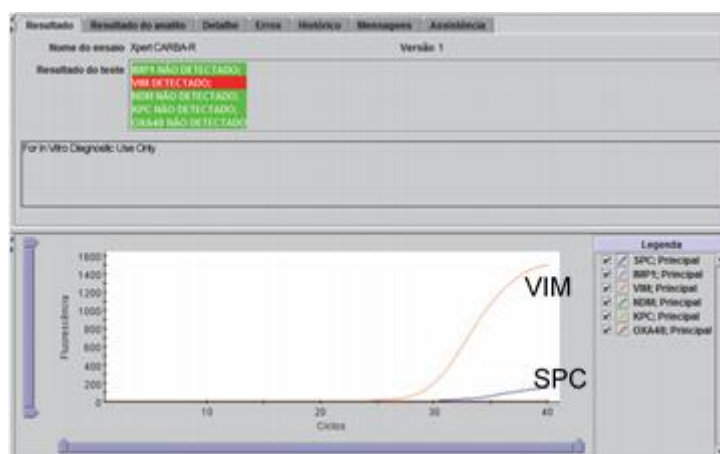


Figura III.19 - Detecção do gene  $bla_{VIM}$  e validação do ensaio (Cepheid, 2020)

- Resultado positivo para os genes *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>* – na Figura III.20 observam-se três curvas, duas correspondentes aos genes *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>*, indicado a sua deteção, e a terceira ao SPC, validando o ensaio.

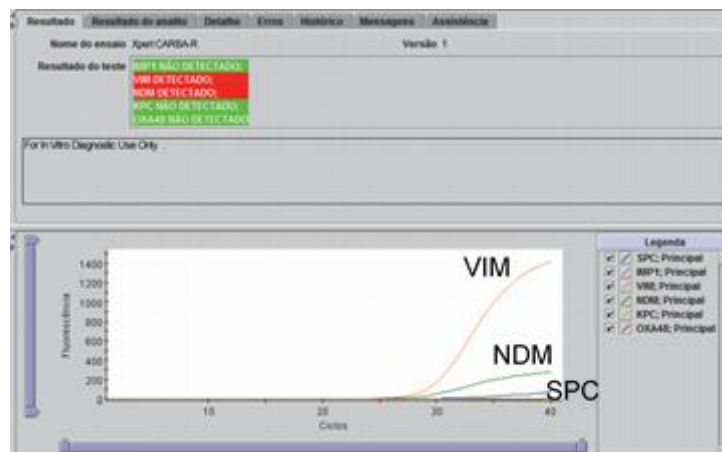


Figura III.20 - Deteção dos genes *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* e validação do ensaio (SPC) (Cepheid, 2020)

- Resultado positivo para os genes *bla<sub>IMP</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>* – na Figura III.21 observam-se três curvas indicando que os genes *bla<sub>NDM</sub>* e *bla<sub>IMP-1</sub>* foram detetados e o ensaio é válido devido à presença da curva do SPC.

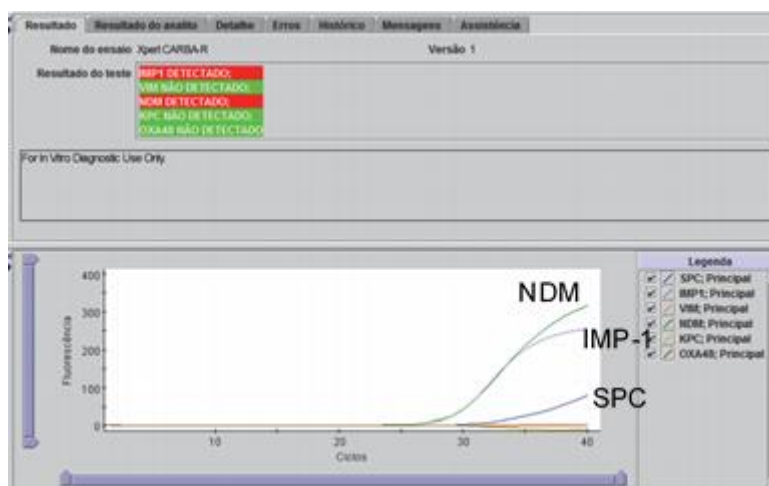


Figura III.21 - Deteção dos genes *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>IMP-1</sub>* e validação do ensaio (Cepheid, 2020)

- Resultado positivo para os genes *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>OXA-48</sub>* – Na Figura III.22 observam-se quatro curvas, três correspondem aos genes *bla<sub>IMP1</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>OXA-48</sub>*, concluindo que foram detetados. A curva do SPC não é muito visível, porque não compete com os genes alvo pelos reagentes, mas permite validar o ensaio



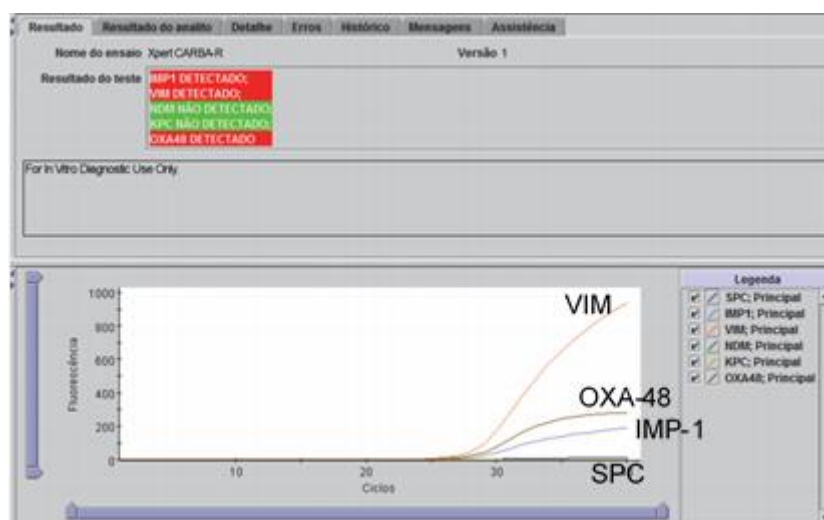


Figura III.22 - Detecção dos genes *bla*<sub>IMP1</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> e validação do ensaio (Cepheid, 2020)

- Resultado positivo para os genes *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>OXA-48</sub> – na Figura III.23 observam-se as curvas correspondentes aos genes indicando a sua deteção. O SPC surge mais abaixo, mas permite validar o ensaio.

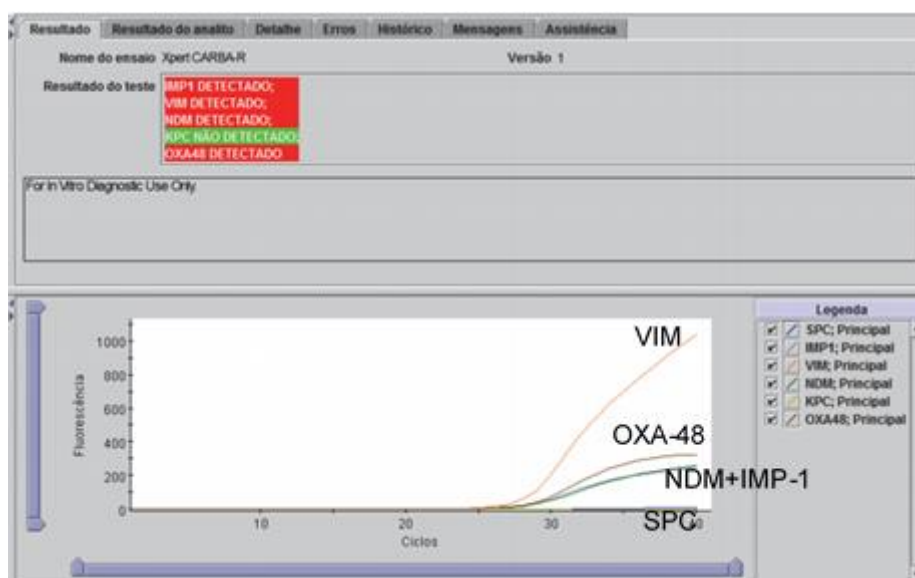


Figura III.23 - Detecção dos genes *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>IMP-1</sub> e validação do ensaio (Cepheid, 2020)

- Resultado positivo para os cinco genes – Na Figura III.24 observam-se 6 curvas, uma corresponde ao SPC, validando o ensaio, e as restantes cinco aos genes *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>KPC</sub>, concluindo-se que foram detetados os cinco genes em simultâneo.

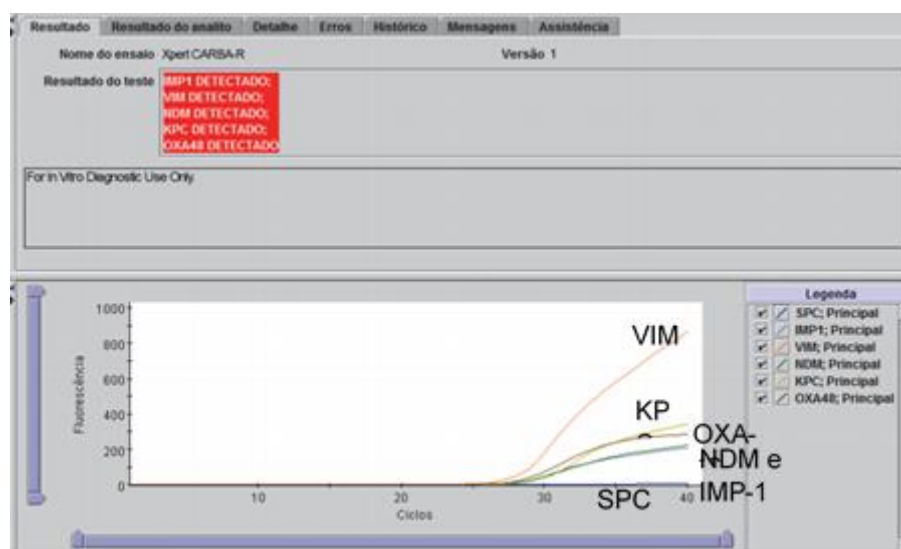


Figura III.24 - Resultado positivo para os cinco genes e validação do (Cepheid, 2020).

- Resultado inválido – na Figura III.25 não se observa a curva do controlo interno SPC, indicando que falhou, e por isso o ensaio é dado como inválido. Esta situação pode ocorrer no caso de presença de inibidores de PCR, quando a amostra não foi processada corretamente ou o volume da amostra adicionada não foi o adequado.

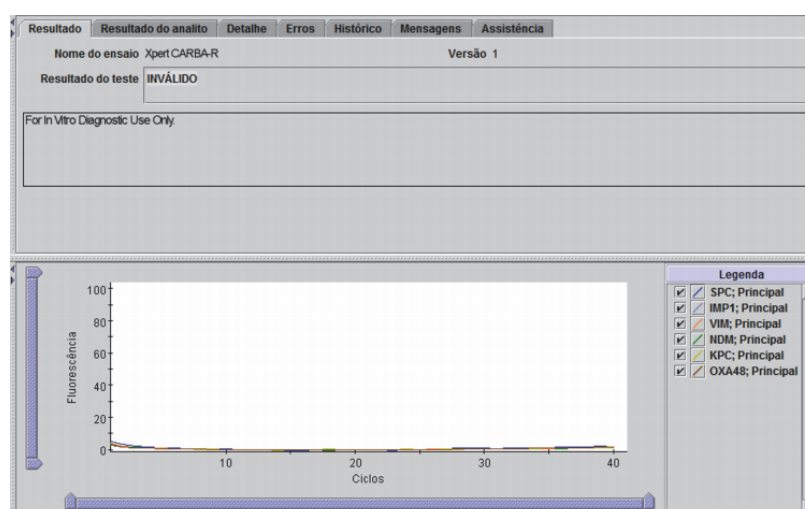


Figura III.25 - Ensaio inválido (Cepheid, 2020)

Devido à pandemia não foi possível obter autorização da comissão de ética para a recolha de resultados e de casos clínicos. Na pesquisa bibliográfica foram encontrados alguns casos apresentados por autores estrangeiros. De seguida é feita uma breve exposição sobre visualização de resultados de pacientes em que se verificou que existia resistência a carbapenemos, e através do ensaio Xpert Carba-R foi possível averiguar qual ou quais as carbapanemases em questão.

Um paciente de sexo masculino, 56 anos, residente no Nepal deu entrada no serviço de urgência do hospital local, com febre e alteração do estado de consciência nos últimos três dias. Como o seu estado de saúde não melhorou foi transferido para a unidade de cuidados intensivos com o diagnóstico de meningoencefalite, foi intubado e ligado a um ventilador e ao fim de sete dias desenvolveu uma pneumonia associada à ventilação. Foram realizados testes microbiológicos a amostras de expetoração sendo isoladas e identificadas as bactérias *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*. O paciente começou a ser tratado com meropenem, mas através de testes de discos de difusão, observou-se que os isolados eram suscetíveis apenas à colistina, tigeciclina e amicacina, e resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas, gentamicina, doxiciclina e cotrimoxazol. Começaram a administração intravenosa de amicacina e colistina por nebulização. O seu estado melhorou, mas ao fim de alguns dias voltou a apresentar febre e hipotensão e adicionaram à terapêutica a tigeciclina. Através de culturas de sangue e urina identificaram isolados colónias de *Providencia* resistentes a vários antibióticos, incluindo a colistina. Após a realização de testes que permitem caracterizar o mecanismo de resistência concluíram que podia tratar-se de uma bactéria produtora da carbapanemase OXA-48. Enviaram colónias para um laboratório de referência onde foi detetado o gene *bla*<sub>OXA-48</sub> através do ensaio Xpert Carba-R, o resultado está ilustrado na Figura III.26. (Sah, et al., 2019).

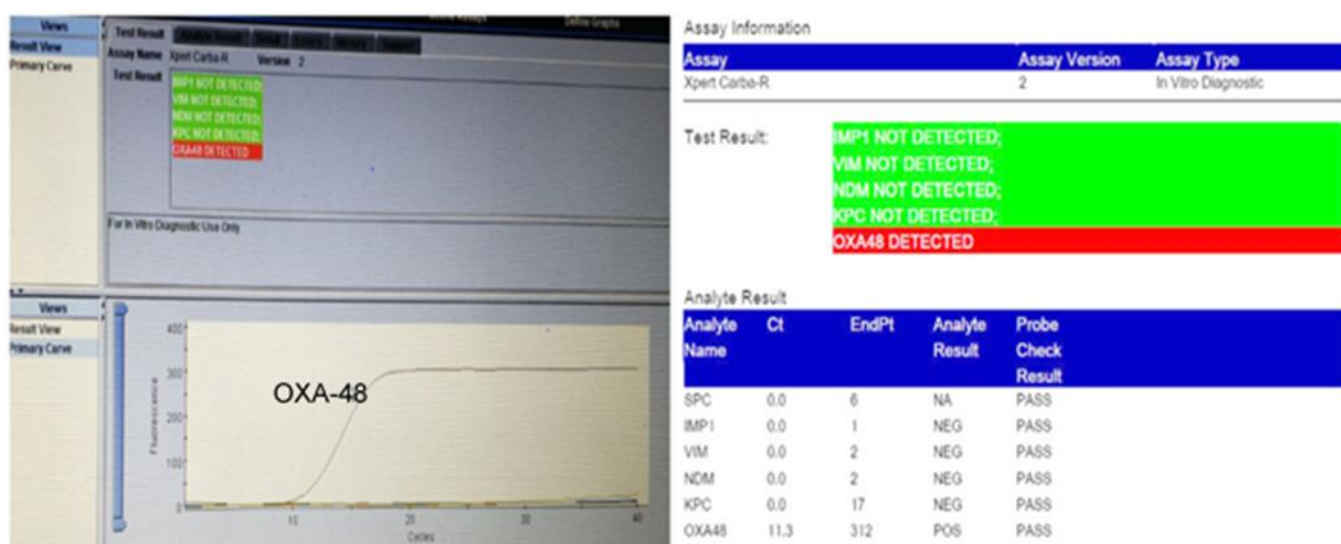


Figura III.26 - Resultado do ensaio Xpert Carba-R onde é detetado o gene *bla*<sub>OXA-48</sub>, gráfico e correspondente tabela (Sah, et al., 2019)

Na Figura III.26 observamos uma curva que corresponde ao gene *bla*<sub>OXA-48</sub> e ao lado os valores de Ct, sendo que o Ct para o gene em questão foi de 11.3. Contata-se que é menor que o referido pelo fabricante (38), sugerindo que a quantidade de gene inicialmente presente seria elevada, sendo necessário um número menor de ciclos para que a amplificação seja detetável.

No seguimento da confirmação da presença de genes *bla*<sub>OXA-48</sub> o paciente foi isolado, mas faleceu devido à falta de outras opções de terapêutica, devido à resistência intrínseca à colistina e à

ausência de outros fármacos no país, nomeadamente de ceftazidima ou aztreonam em combinação com avibactam, um inibidor de carbapanemase (Sah, et al., 2019).

Os autores referem que em países em desenvolvimento, como o Nepal, os testes moleculares para a deteção dos genes não são opção devido aos custos que o ensaio acarreta e por isso recorrem inicialmente aos testes não moleculares, como os referidos acima, para a deteção de bactérias resistentes a carbapenemos e posteriormente, se necessário, recorrem aos moleculares. O ensaio Xpert Carba-R permitiu a deteção de uma carbapanemase que não era comumente registada no país (Sah, et al., 2019).

Os carbapenemos são considerados fármacos de último recurso no tratamento de infeções provocadas por Gram negativos, no entanto têm sido cada vez mais utilizados conduzindo ao aparecimento de *Enterobacteriaceae* resistentes. Os tratamentos disponíveis contra estas bactérias são reduzidos e incluem o uso de fosfomicina, tigeciclina, aminoglicosídeos e polimixinas. Para o tratamento de casos em que se verifique resistência aos carbapenemos está indicado o uso de colistina, tigeciclina e fosfomicina em combinação com ceftazidima+avibactam ou aztreonam+avibactam, mas o seu uso está limitado devido aos efeitos secundários.

Os casos apresentados de seguida correspondem a pacientes com infeções por *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras dos cinco genes, internados numa UCI de um hospital no Nepal.

Na Tabela III.9 estão representados três casos onde consta informação acerca dos pacientes, qual a amostra analisada, a bactéria identificada, quais os genes identificados pelo ensaio Xpert Carba-R a partir dos isolados e qual o tratamento aplicado a cada um (Sah, et al., 2020)

Tabela III.9 - Representação de três casos, indicando qual a amostra analisada, a bactéria e genes identificados e o tratamento aplicado (Sah, et al., 2020)

Caso	Idade/sexo	Amostra	Bactéria	Gene identificado	Tratamento
1	40/Feminino	Urina e sangue	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>NDM</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC</sub> , e <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Fosfomicina/14 dias
2	52/Masculino	Expetoração e sangue	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC</sub> e <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Colistina e tigeciclina/ 10 dias
3	48/Masculino	Líquido ascítico e sangue	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>IMP</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM</sub> e <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	Colistina e tigeclina/10 dias

De seguida são apresentados os resultados obtidos pelo ensaio Xpert Carba-R aquando da análise dos isolados obtidos após a identificação e isolamento das estirpes referidas. De salientar que estes resultados são retirados do estudo feito pelos autores (Sah, et al., 2020). Pode-se constatar a possibilidade de existirem vários genes de carbapanemases em simultâneo e a capacidade do ensaio de os detetar.

Na Figura III.27 pode-se ver os resultados obtidos após a análise de isolados de *E. coli* e verifica-se que foram detetados três genes *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>OXA-48</sub>. Os valores de Ct diferem entre si dando indicação que existe diferença na quantidade inicial do gene, neste caso os genes de *bla*<sub>OXA-48</sub> e *bla*<sub>KPC</sub> estão em predominância em relação ao *bla*<sub>NDM</sub>.

Assay Information				
Assay	Assay Version		Assay Type	
Xpert Carba-R	2		In Vitro Diagnostic	
Test Result:				
IMP1 NOT DETECTED;				
VIM NOT DETECTED;				
NDM DETECTED;				
KPC DETECTED;				
OXA48 DETECTED				
Analyte Result				
Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
SPC	0.0	-7	NA	PASS
IMP1	0.0	3	NEG	PASS
VIM	0.0	6	NEG	PASS
NDM	34.4	137	POS	PASS
KPC	25.4	564	POS	PASS
OXA48	25.8	375	POS	PASS

Figura III.27-Resultado positivo para a deteção dos genes *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>OXA-48</sub> em *E.coli* (Sah, et al., 2020).

Na Figura III.28 os resultados correspondem à análise de isolados de *K. pneumoniae* onde foram detetados os genes *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>OXA-48</sub> e os valores de Ct não variam muito entre si.

Assay Information				
Assay	Assay Version		Assay Type	
Xpert Carba-R	2		In Vitro Diagnostic	
Test Result:				
IMP1 NOT DETECTED;				
VIM DETECTED;				
NDM DETECTED;				
KPC DETECTED;				
OXA48 DETECTED				
Analyte Result				
Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
SPC	0.0	-6	NA	PASS
IMP1	0.0	-1	NEG	PASS
VIM	28.7	387	POS	PASS
NDM	24.3	315	POS	PASS
KPC	24.8	580	POS	PASS
OXA48	25.6	378	POS	PASS

Figura III.28 - Resultado positivo para a deteção dos genes *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>OXA-48</sub> em *K. pneumoniae* (Sah, et al., 2020).

Na Figura III.29 estão ilustrados os resultados obtidos na análise de isolados de *E. coli* e foram detetados os genes *bla*<sub>IMP1</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>OXA-48</sub>.

Assay Information				
Assay	Assay Version		Assay Type	
Xpert Carba-R	2		In Vitro Diagnostic	
Test Result:	<div>IMP1 DETECTED;</div> <div>VIM DETECTED;</div> <div>NDM DETECTED;</div> <div>KPC NOT DETECTED;</div> <div>OXA48 DETECTED</div>			
Analyte Result				
Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
SPC	0.0	4	NA	PASS
IMP1	37.0	51	POS	PASS
VIM	27.7	889	POS	PASS
NDM	35.2	117	POS	PASS
KPC	0.0	-39	NEG	PASS
OXA48	25.3	357	POS	PASS

Figura III.29 - Detecção de genes blaIMP1, blaVIM, blaNDM e blaOXA-48 em E. coli (Sah, et al., 2020).

## **Capítulo IV**

## Conclusões

A resistência a antibióticos é um grave problema de saúde pública, sendo a produção de  $\beta$ -lactamases um dos mais significante mecanismo de resistência porque são produzidas na sua maioria por bactérias Gram negativas, nomeadamente *Enterobacteriaceae* entre outras. Dentro das  $\beta$ -lactamases encontram-se as carbapanemases, enzimas com capacidade de hidrolisarem carbapenemos e outros  $\beta$ -lactâmicos. São divididos por três classes, A, B e D, variando o seu perfil de hidrólise e inibição de atividade por inibidores específicos. A deteção de bactérias resistentes a carbapenemos pode ser feita recorrendo a métodos não moleculares, baseados em meios de cultura, dependentes de etapas de incubação, e moleculares, que permitem detetar genes específicos de carbapanemases. Os métodos moleculares, como a multiplex PCR permitem apenas a deteção de genes e a sua automatização em sistemas como o GeneXpert veio permitir a sua implementação em vários tipos de laboratórios. O sistema permitiu simplificar o processo de pesquisa ao concentrar todos as etapas de processamento da amostra no interior de um cartucho, eliminando assim riscos de contaminação e de erros inerentes ao operador. A grande limitação reside no facto de que só deteta genes conhecidos e podem ocorrer resultados falso negativos, ou seja, pode estar em causa outro gene diferente dos pesquisados. Assim, a combinação com outro método pode ser uma opção.

A deteção precoce de ERC e a implementação de medidas de controlo são cruciais para prevenir a sua propagação, evitando surtos. É importante referir que os métodos culturais que demonstram a suscetibilidade a antibióticos apenas permitem detetar isolados resistentes a carbapenemos. No entanto, alguns podem ser portadores de genes de carbapanemases que não conferem resistência aos carbapenemos, não sendo detetados e dando resultados falso negativos. Também pode acontecer que ocorram resultados falso positivos porque as estirpes podem ser resistentes a carbapenemos sem produzirem carbapanemases. No caso de organismos produtores de carbapanemases, os genes responsáveis estão localizados em elementos móveis do material genético e por isso são mais facilmente propagáveis. Assim para a correta implementação de medidas de controlo de infeção e preciso saber qual o tipo de mecanismo em causa. Em termos terapêuticos, o conhecimento de qual o tipo de carbapanemase interfere na escolha do tratamento mais adequado ao paciente, porque não são todas inibidas pelo mesmo fármaco.

A aplicação de métodos baseados em PCR pode ser comprometida devido a razões económicas, porque os equipamentos utilizados são mais caros. No entanto, estes métodos já provaram que são mais sensíveis e apresentam valores de LoD mais baixos que os métodos culturais.

A Biologia Molecular é uma secção que tem vindo a ganhar terreno dentro do laboratório, sendo que todas as técnicas têm como base a PCR, uma técnica que existe há muitos anos e que tem vindo a ser adaptada a várias áreas, nomeadamente a clínica. A aplicação da PCR como método de pesquisa de carbapanemases permitiu tornar este processo mais sensível, devido ao uso de volumes de amostra reduzidos. Para além disto, é uma técnica muito específica porque são aplicadas sequências específicas dos genes alvo, os *primers*, e para a sua deteção utilizam-se as sondas marcadas que também são desenhadas de forma específica ao alvo.



Anteriormente, no CHULC a pesquisa era feita apenas na secção de microbiologia, utilizando meios cromogénicos, que requeriam um tempo de incubação de 18 a 24 horas e não era possível utilizar apenas um meio para a deteção em simultâneo. Os pacientes ficavam em isolamento até os clínicos saberem os resultados, o que implicava a reorganização do serviço e o gasto de EPI, que no caso de os resultados serem negativos eram gastos sem necessidade. Com o objetivo de melhorar a resposta, a secção de Biologia Molecular começou a realizar a pesquisa de carbapanemases no sistema GeneXpert. Uma vez que a análise pode ser feita a partir de uma zaragatoa rectal, não é necessário fazer a pesquisa de carbapanemases apenas na secção de Microbiologia. Este aparelho é adaptável às condições do laboratório, permitindo o uso de diferentes matrizes.

O facto de ser sensível, permite o uso de amostras em quantidade reduzida, sem ter de recorrer a períodos de incubação, sendo os resultados mais rápidos. Em termos de manuseamento por parte do operador, o processo é simples e relativamente fácil, tendo atenção à quantidade de matéria fecal, à homogeneização da zaragatoa no frasco de reagente. O resultado depende de uma colheita correta e por isso quem as realiza deve ser sensibilizado sobre o procedimento adequado para que a amostra seja a mais representativa possível da flora bacteriana.

Todos os métodos disponíveis no mercado apresentam vantagens e desvantagens, sendo que variam em termos de sensibilidade e especificidade. O ensaio Xpert Carba-R permite a pesquisa rápida e precisa de genes, sendo que a sua especificidade é uma vantagem, devido ao uso de *primers* e sondas desenhadas especificamente para detetar sequências alvo.

A utilização do sistema GeneXpert permitiu melhorar o tempo de resposta, de 18 a 24 horas para 50 minutos, evitando assim isolamentos desnecessários, tratamentos inadequados e gasto de material de proteção, tão escasso nos dias que correm e que devem ser utilizados corretamente. No entanto, estes tipos de organismos já se encontram disseminados pela comunidade, devido ao uso incorreto de antibióticos e por isso seria importante realizar esta pesquisa não só apenas a nível hospitalar.

Este relatório teve limitações relacionadas com a obtenção de dados devido à proteção de dados, uma vez que o início do trabalho coincidiu com a pandemia de COVID19 e todas as atividades relacionadas com formação foram interrompidas, não sendo possível requerer autorização à Comissão de Ética. Em relação ao ensaio, foram pedidas informações ao fabricante sendo recusado o pedido visto que consideraram como sendo dados confidenciais.

Seria interessante em estudos futuros avaliar a combinação dos métodos moleculares e não moleculares, desenhando um plano eficaz para a pesquisa de carbapanemases adaptável a vários tipos de laboratórios.

Através deste relatório foi possível aprender e compreender melhor o ensaio Xpert Carba-R, percebendo a sua finalidade, vantagens e desvantagens.

A escrita deste relatório foi iniciada em pleno confinamento e permitiu ver o mundo “invisível” com outros olhos, ver como um organismo consegue ser tão complexo ao ponto de conseguir resistir a fármacos desenvolvendo mecanismos complexos de resistência.

## Bibliografia

- Altamimi, M., Alsalamah, A., Alkhulaifi, M., & Alajlan, H. (2016). Comparison of phenotypic and PCR methods for detection of carbapenemase production by Enterobacteriaceae. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 155-161. doi:10.1016/j.sjbs.2016.07.004
- Al-Zahrani, I. A. (Setembro de 2018). Routine detection of carbapenem-resistant gram-negative bacilli in clinical laboratories. *Saudi Med J*, 39(9), 861–872. doi: 10.15537/smj.2018.9.22840
- Banerjee, R., & Humphries, R. (2017). Clinical and laboratory considerations for. *Virulence*, 8(4), 427-439. doi: 10.1080/21505594.2016.1185577
- Baumforth, K. R., Nelson, P. N., Digby, J. E., O'Neil, J. D., & Murray, P. G. (1999). Demystified ... The Polymerase Chain Reaction. *Journal Clinical Pathology*, 52, 1-10.
- Bialvaei, A. Z., Kafil, H. S., Asgharzadeh, M., Memar, M. Y., & Yousefi, M. (2016). Current Methods for the Identification of Carbapenemases. *Journal of Chemotherapy*, 28(1), 1-19. doi: 10.1179/1973947815Y.0000000063
- Cepheid . (2016). *Manual do operador - Sistema GeneXpert Dx* .
- Cepheid. (Junho de 2020). Xpert Carba-R. California, USA.
- Chung, H.-S., Yang, N., Kim, Y., Lee, M., & Park, S. (2020). Performance of Xpert Carba-R assay for Identification of Carbapenemase Gene in the clinical microbiology laboratory. *The EWHA Medical Journal*, 43(3), 39-42. doi:10.12771/emj.2020.43.3.39
- COELHO, A. M. (2013). *PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE COM TRANSCRIÇÃO REVERSA EM TEMPO REAL PARA QUANTIFICAÇÃO DOS VÍRUS QUIMÉRICOS FA17D/DEN1, 2, 3, 4 CANDIDATOS A VACINA TETRAVALENTE CONTRA A DENGUE*. Rio de Janeiro: Fiocruz.
- Cui, X., Zhang, H., & Du, H. (2019). Carbapenemases in Enterobacteriaceae: detection and antimicrobial therapy. *Frontiers in microbiology*, 1-12. doi:10.3389/fmicb.2019.01823
- Cury, Ana-Paula; Junior, J. N. Almeida; Costa, Silvia F. ; Salomão, Matias C. ; Boszczowski, Ícaro; Duarte, Alberto J.S.; Rossia, Flávia. (2020). *Journal of Microbiological Methods*, 1-8. doi:10.1016/j.mimet.2020.105884
- d'Aleo, F., Ceccarelli, M., Facciola, A., Rullo, E. V., Paolucci, I., Costantino, M. R., . . . Pellicanò, G. F. (2018). Current fast methods for. *Infections Diseases and Tropical Medicine*, 4(2), 1-7.
- DELTALAB. (16 de Outubro de 2020). Obtido de Web site de Deltalab: <http://www.deltalab.es/>
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction . *Journal of Investigative Dermatology* , 133(6), 1-4. doi:10.1038/jid.2013.1
- Gavronski, S. (2017). *INVESTIGAÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS EM ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS EM UM HOSPITAL DE BLUMENAU/SC: DETECÇÃO LABORATORIAL E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS*. Florianópolis.
- Genc, O., Aksu, E., & Gulcan, A. (2016). the identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae by using molecular assay and phenotyping confirmation tests. *Journal of microbiological Methods*, 8-11. doi:10.1016/j.mimet.2016.03.010
- HAAS, D. J., & TORRES, A. C. (2016). APLICAÇÕES DAS TÉCNICAS DE PCR NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS DOS ANIMAIS. *REVISTA CIENTÍFICA DE MEDICINA VETERINÁRIA*(26).
- Ko, Y. J., Kim, J., Kim, H.-N., Yoon, S.-Y., Lim, C. S., & Lee, C. K. (2019). Diagnostic performance of the Xpert Carba-R assay for active surveillance of rectal carbapenemase-producing organisms in intensive care unit patients. *Antimicrobial resistance and Infection Control*, 1-8. doi:10.1186/s13756-019-0579-2

- Lee, C.-R., Lee, J. H., Park, K. S., Kim, Y. B., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2016). Global dissemination of Carbapenemase-Producing: Epidemiology, Genetic context, Treatment Options and Detection Methods. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-30. doi:10.3389/fmicb.2016.00895
- Lutgring, J. D., & Limbago, B. M. (Março de 2016). The Problem of Carbapenemase-Producing Carbapenem-Resistant-Enterobacteriaceae Detection. *J Clin Microbiol*, 529-534. doi:10.1128/JCM.02771-15
- Markoulatos, P., Siafakas, N., & Moncany, M. (2002). Multiplex Polymerase Chain Reaction: a practical Approach. *Journal of Clinical Laboratory analysis*, 47-51. doi:10.1002/jcla.2058
- Mitsakakis, K., D'Acremont, V., Hin, S., Stetten, F. V., & Zengerle, R. (2018). Diagnostic tools for tackling febrile illness and enhancing patient management. *Microelectronic Engineering*, 26-59. doi:10.1016/j.mee.2018.10.001
- Mlynarcik, P., Roderova, M., & Kolar, a. M. (2 de Janeiro de 2016). or PCR and its Application for Detection of Carbapenemases in Enterobacteriaceae. 9(1), pp. 1-6. doi: 10.5812/jjm.29314
- Monteiro, J., Raymond, H., C.Pignatari, C., A., Kubasek, C., & Silbert, S. (2012). Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 906-909. doi:10.1093/jac/dkr563
- Moore, N. M., Cantón, R., Carretto, E., Peterson, L. R., Sautter, R. L., & Traczewski, M. M. (2017). Rapid Identification of Five Classes of Carbapenem Resistance Genes Directly from Rectal Swabs by use of the Xpert Carba-R assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(7), 2268-2275. doi:10.1128/JCM.00137-17
- Nagy, A., Vitásková, E., Černíková, L., Křivda, V., Jiřincová, H., Sedlák, K., . . . Havlíčková, M. (2017). Evaluation of TaqMan qPCR System Integrating Two Identically Labelled Hydrolysis Probes in Single Assay. *Scientific Reports*, 1-10. doi: 10.1038/srep41392
- Nordmann, P., & Poirel, L. (2012). Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 487-489. doi:10.1093/jac/dks426
- Nordmann, P., Gniadkowski, M., Giske, C. G., Poirel, L., Woodford, N., & Miriagou, V. (2012). Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology and Infection*(18), 432-438. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03815.x
- Novais, C.-M., Alves, M.-P., & Silva, F.-F. (2004). PCR em tempo real - Uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*(33), 10-13.
- Oliveira, M. C., Regitano, L. C., Roese, A. D., Anthonisen, D. G., Patrocínio, E. d., Parma, M. M., . . . Jardim, S. N. (2007). *Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase*. São Paulo: Embrapa.
- Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infections Disease*(70), 11-123. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002
- Queenan, A.-M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, 20(3), 440-458. doi:10.1128/CMR.00001-07
- Sah, R., Khadka, S., Shrestha, G. S., Acharya, S., Aryal, D., Shrestha, P., . . . Erdem, H. (2019). Detection of Pan drug resistance OXA-48 producing Providencia in an ICU patient for the first time in Nepal. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 1-7. doi:10.1186/s13756-019-0608-1

- Sah, R., Rodriguez-Morales, A. J., Pokhrel, N., Donovan, S., Shrestha, G. S., Fazal, F., . . . Erdem, H. (24 de Fevereiro de 2020). Various combinations of Carbapenemase production in community-acquired clinical isolates in Nepal . pp. 1-17. doi:10.21203/rs.2.24355/v1
- Saúde, D. G. (2017). *PPCIRA - Prevenção da transmissão de Enterobacteriaceas resistentes aos carbapenemos em hospitais de cuidados agudos*.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 1014-1026. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
- Sekyere, J. O., Govinden, U., & Essack, S. Y. (2015). Review of established and innovative detection methods. *Journal of Applied Microbiology*(119), 1219-1233. doi:10.1111/jam.12918
- Tato, M., Garbajosa, M., Traczewski, M. D., McEwan, A., Humphries, r., Hindler, J., . . . Wang, H. C. (2015). Multisite Evaluation of Cphed Xpert Carba-R assay for Detection of Carbapenemase-Producing Organisms in rectal Swabs. *Journal of clinical Microbiology*, 1814-1819. doi:10.1128/JCM.00341-16
- Taylor, M. T., Belgrader, P., Furman, B. J., Pourahmadi, F., Kovacs, G. T., & Northrup, a. M. (2001). Lysing Bacterial Spores by Sonication through a Flexible Interface in a Microfluidic System. *Analytical Chemistry*, 73(1), 492-496. doi:10.1021/ac000779v
- Traczewski, M. M., Carretto, E., Canton, R., & Moore, N. M. (2018). Multisite evaluation of the xpert carba-R assay for detection of carbapenemase genes in Gram-negative Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(8), 1-8. doi:10.1128/JCM.00272-18
- Ulrich, M., Christensen, D., Coyne, S., Craw, P., Henchal, E., Sakai, S., . . . Norwood, D. (2006). *Journal of Applied Microbiology* , 1011-1016. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02810.x
- Vandeventer, P. E., Weigel, K. M., Salazar, J., Erwin, B., Irvine, B., Doeblner, R., . . . Niemz, A. (2011). Mechanical Disruption of Lysis-Resistant Bacterial Cells by Use of a Miniature, Low-Power, Disposable Device. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 49(7), 2533–2539. doi:10.1128/JCM.02171-10
- Viau, R., Frank, K. M., Jacobs, M. R., Wilson, B., Kaye, K., Donskey, C. J., . . . Bonomo, R. A. (Outubro de 2015). (C. M. Reviews, Ed.) *Intestinal Carriage of Carbapenemase-Producing Organisms: Current Status of Surveillance Methods*, 29(1). doi: 10.1128/CMR.00108-14
- Weib, D., Engelmann, I., Braun, S. D., Monecke, S., & Ehricht, R. (2017). A multiplex real-time PCR for direct, fast, economic and simultaneous detection of the carbapenemase genes blaKPC, blaNDM, blaVIM e blaOXA-48. *Journal of Microbiological Methods*, 142, 20-26. doi:10.1016/j.mimet.2017.08.017
- Yu, M., Cao, Y., & Ji, Y. (2017). The principle and application of new PCR Technologies . pp. 1-4. doi:10.1088/1755-1315/100/1/012065

## **Anexos**

## Anexo I Curriculum Vital

INFORMAÇÃO PESSOAL	Vera Lúcia Martins Fevereiro Ruivo de Sousa
PROFISSÃO	Técnica Superior de Diagnóstico e Terapêutica - Análises Clínicas e Saúde Pública
EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL	
2020 – Presente	<b>Técnica de Análises Clínicas e Saúde Pública 2ª Classe</b>  Centro Hospitalar Barreiro Montijo Laboratório de Urgência do serviço de Patologia Hospitalar Barreiro Montijo.  As competências que me são delegadas apresentam-se na recolha, receção, triagem e análise de amostras biológicas provenientes dos serviços de urgência.
06/2005 – 2019	<b>Técnica de Análises Clínicas e Saúde Pública 2ª Classe</b>  Centro Hospitalar de Lisboa Zona Central Laboratório de Urgência do serviço de Patologia Clínica do Hospital de São José.  As competências que me são delegadas apresentam-se na recolha, receção, triagem e análise de amostras biológicas provenientes de várias localizações do Centro Hospitalar de Lisboa. Embora as minhas valências se apresentem principalmente na área operacional dos serviços de análises clínicas é importante realçar as imputações secundárias mas de igual forma importantes ao desempenho da minha atividade através da manutenção de aparelhos de bioquímica, hematologia e coagulação
10/2004 – 06/2005	<b>Técnica de Análises Clínicas e Saúde Pública</b> Hospital Egas Moniz  As funções exercidas envolviam atendimento aos utentes nas diversas enfermarias, nestas efetuava as respetivas colheitas de sangue e tratamento administrativo das amostras colhidas.
EDUCAÇÃO E FORMAÇÃO	
Formação Académica	<b>Licenciatura em Técnica de Análises Clínicas e Saúde Pública</b> Escola Superior de Saúde Egas Moniz, Monte de Caparica Conclusão no ano de 2005 com a média 15 valores.  Realizei um estágio curricular, no Hospital de São José, composto por vários módulos, cada um com a duração de 4 semanas: Colheitas, Imunologia, Imuno-hemoterapia, Hematologia, Microbiologia e Bioquímica

## EDUCAÇÃO E FORMAÇÃO

### Formação Académica

#### Licenciatura em Técnica de Análises Clínicas e Saúde Pública

Escola Superior de Saúde Egas Moniz, Monte de Caparica

Conclusão no ano de 2005 com a média 15 valores.

Realizei um estágio curricular, no Hospital de São José, composto por vários módulos, cada um com a duração de 4 semanas: Colheitas, Imunologia, Imuno-hemoterapia, Hematologia, Microbiologia e Bioquímica

### Congressos/Seminários

- Jornadas Técnico-Científicas de Análises Clínicas e Saúde Pública e Anatomia Patológica organizado pela Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa – 1, 2 e 3 de Março de 2002.
- Gestão e garantia da Qualidade no Laboratório de Análises Clínicas, realizado no Instituto Superior de Ciências da Saúde – Sul – 31 de Janeiro de 2004.
- I Congresso do Departamento das Ciências e tecnologias Laboratoriais e Intervenção Comunitária organizado pela Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa – 28 de Maio de 2004.
- “Infeções Sexualmente Transmissíveis, HIV, Género e Violência” – 8 e 9 de Março de 2005 no Instituto de medicina Tropical de Lisboa.
- Conferências de Biologia Molecular realizadas na Escola Superior de Saúde Egas Moniz – 3 e 4 de Março de 2006.
- Congresso Técnico de Análises Clínicas e Saúde Pública realizado nos Hospitais da universidade de Coimbra – 4 e 5 de Novembro de 2006
- Congresso de Análises Clínicas e Saúde Pública APTAC 2008
- VI Congresso de Análises Clínicas e Saúde Pública da Sociedade Portuguesa de bio Analistas Clínicos

### Cursos/Formações

Frequentei os seguintes cursos, realizados pela Associação portuguesa dos Técnicos de Análises Clínicas e Saúde Pública:

- Curso teórico-prático de PCR em Tempo Real
- Curso teórico prático de Citometria de Fluxo
- Curso de Diagnóstico Molecular
- Curso de Análises de Gases no Sangue
- Curso de Microscopia Hematológica Avançada

Frequentei os seguintes cursos ministrados na Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa:

- II Curso Prático de PCR em Tempo Real
- 4º Curso Prático Laboratorial de Diagnóstico Genético

#### Outras formações concluídas em âmbito profissional:

- Operadores de LH750
- Sessão Prática de sistemas COBAS Integra 800
- Vitros 5600
- Interpretação de Curvas do Coagulometro ACL TOP II
- Sistema Informático Clinidata e HCIS
- Controlo de Qualidade - Conceitos Básicos
- Curso de Genética Molecular e Hematologia



## COMPETÊNCIAS PESSOAIS

Língua materna Português

Outras línguas

inglês

COMPREENDER		FALAR		ESCREVER
Compreensão oral	Leitura	Interação oral	Produção oral	
B2	B2	B2	B2	B1

Níveis: A1/A2: Utilizador básico - B1/B2: utilizador independente - C1/C2: utilizador avançado  
[Quadro Europeu Comum de Referência para as Línguas](#)

Competências de  
comunicação

- Boa capacidade de aprendizagem
- Capacidade de adaptação a novos meios e novos instrumentos de trabalho
- Excelentes capacidades de comunicação com colegas e utentes.

Competências de  
organização

- Gosto por trabalho em equipa
- Interesse por Investigação e desenvolvimento nas áreas da saúde
- Capacidade de resistir a ambientes de Stress
- Habilidade de apresentar resultados dentro dos objetivos
- Gosto em construir um clima de confiança e boa disposição na equipa
- Interesse participar na inovação do serviço através de apresentação de propostas de melhoria

Competências relacionadas  
com o trabalho

- Interesse pela área de saúde
- XXXXXXXXXX *Aparelhos e Tecnologias Hospitalares* XXXXX

Competências informáticas

- Conhecimentos 10 anos de experiência nas ferramentas informáticas Excel, Word, Power Point, Internet Explorer e e-mail em ambientes Windows
- Conhecimentos nas aplicações de sistemas de informação hospitalares tais como Clinidata e HCIS

## Anexo II Certidão de Licenciatura

